

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 022**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61B 5/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012 PCT/US2012/027391**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12121998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12709440 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2681554**

54 Título: **Dispositivo de extracción de sangre que contiene inhibidor de lisofosfolipasa**

30 Prioridad:

04.03.2011 US 201161449337 P

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

01.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CRAFT, DAVID y
APTE, PRIYANKA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 645 022 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de extracción de sangre que contiene inhibidor de lisofosfolipasa

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La diabetes es un síndrome de metabolismo alterado, normalmente debido a una combinación de causas hereditarias y ambientales, que dan lugar a unos niveles de azúcar en sangre anormalmente altos (hiperglucemia). Los niveles de glucosa en sangre son controlados por una interacción compleja de múltiples productos químicos y hormonas en el cuerpo que incluyen la hormona insulina generada en las células beta del páncreas. La diabetes mellitus se refiere al grupo de enfermedades que conduce a unos elevados niveles de glucosa en sangre debido a los defectos o bien en la secreción de insulina o bien en la acción de la insulina en el cuerpo.

La diabetes se desarrolla debido a una producción disminuida de insulina (en el tipo 1) o a la resistencia a sus efectos (tipo 2 y gestacional). Ambas conducen a la hiperglucemia, que en gran parte producen los síntomas de la diabetes, a saber, excesiva producción de orina, lo que da lugar a una sed compensatoria e ingesta de fluidos aumentada, visión borrosa, pérdida de peso inexplicable, aletargamiento, y cambios en el metabolismo de la energía.

Las inyecciones mediante una jeringuilla, bomba de insulina, o bolígrafo de insulina administran insulina, que es un tratamiento básico de la diabetes de tipo 1. La diabetes de grupo 2 se trata con una combinación de un tratamiento dietético, ejercicio, medicamentos y suplemento de insulina. Todas las formas de diabetes son tratables dado que la insulina está médicamente disponible, pero todavía no tiene cura.

De acuerdo con un informe de la Organización Mundial de la Salud en 2000, al menos 171 millones de personas en el mundo padecían diabetes, o el 2,8 % de la población. Su incidencia está aumentando rápidamente, sin embargo se estima que para el año 2030, este número será de casi el doble. La diabetes mellitus se produce en todo el mundo, pero es más común (especialmente el tipo 2) en los países más desarrollados. El mayor incremento de preponderancia, sin embargo, se espera que se produzca en Asia y África, en donde es probable que se encuentren la mayoría de los pacientes para el año 2030.

El péptido como glucagon (GLP-1), péptido de inhibición gástrica (GIP), glucagon y grelina han sido reportados como biomarcadores pépticos de las enfermedades metabólicas tales como la diabetes. La principal fuente de GLP-1 en el cuerpo se encuentra en los intestinos. La concentración en sangre típica normal de GLP-1 en circulación está comprendida entre 3-85 picomolar. GLP-1 posee varias propiedades fisiológicas que lo convierten en una materia de intensa investigación como tratamiento potencial de la diabetes. Gautier et al., Diabetes Met. 31; 233-42 (2005). Se sabe que el GLP-1 aumenta la secreción de insulina del páncreas, disminuye la secreción de glucagon del páncreas, aumenta la masa de células beta y la expresión del gen de insulina, inhibe la secreción de ácido y el vaciado gástrico del estómago y disminuye la entrada de comida por aumentar la saciedad. Baggio, et al., J, Gastroenterol. 132:2131-57 (2007). Una vez en circulación, sin embargo, se ha reportado que el GLP-1 presenta una media vida biológica corta de aproximadamente 1,5 - 5 minutos (Hui, et al. Eur. J. Endocrinol. 146:863-9 (2002)), debido a la degradación proteolítica causada por las proteasas que incluyen la dipeptidil peptidasa (DPP) - IV.

La forma activa de GIP es un 42-amino ácido polipéptido representado por la secuencia: YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGGKNDKHNITGO ("GIP₍₁₋₄₂₎"). El GIP₍₁₋₄₂₎ es sintetizado por las células K que se encuentran en la mucosa del duodeno y el yeyuno del conducto gastrointestinal. Se cree que GIP₍₁₋₄₂₎ induce la secreción de insulina a través de un mecanismo que implica la interacción entre GIP y 7 receptores transmembrana GIP₍₁₋₄₂₎ en las células beta pancreáticas. La concentración normal en ayunas de GIP₍₁₋₄₂₎ en plasma es de aproximadamente 6 - 12 pmol/L, mientras que la concentración normal no en ayunas es de aproximadamente 80-300 pmol/L. Se ha reportado que GIP₍₁₋₄₂₎ presenta una media vida en circulación de aproximadamente 5 minutos.

Glucagon, un 29-amino ácido péptido, está implicado en el metabolismo de los carbohidratos. Producido por el páncreas se libera cuando el nivel de glucosa en la sangre es bajo (hipoglucemia). Se une a los receptores en las células del hígado (hepatocitos) haciendo que el hígado convierta el glicógeno almacenado en glucosa y libere después de glucosa al torrente sanguíneo. Cuando estos almacenes se reducen, el glucagon entonces estimula la síntesis de glucosa adicional en el hígado. La acción de glucagon es de este modo opuesta a la de la insulina, que da instrucciones a las células del cuerpo para asimilar la glucosa procedente de la sangre. El glucagon también regula el régimen de producción de glucosa a través de un proceso conocido como lipólisis. La concentración en sangre típica normal de glucagon en circulación es de 11 - 17 picomolar. Una vez en circulación, el glucagon tiene una media vida de aproximadamente 8 - 18 minutos.

La grelina es una hormona producida principalmente por las células P/D1 que recubren el fundus del estómago humano y las células épsilon del páncreas que estimulan el apetito. La concentración en sangre típica normal está también en el rango picomolar. La grelina es un 28-amino ácido péptido que tiene la secuencia NH₂-GSSFLSPEHQRVQQRKESKPPAKLQPR-COOH. Una de las formas biológicamente activas de este péptido, conocida como grelina acilada, contiene un grupo n-octanol en Ser3 (es decir, -CH₃(CH₂)₆COO-).

Este péptido ejerce acciones endocrinas tales como la estimulación de la liberación de Hormona del Crecimiento (GH) de la glándula pituitaria, y diversos efectos fisiológicos tales como la inducción de adiposidad (aumento del tejido graso) y aumento de peso corporal debido a los efectos de estimulación del apetito e ingesta de comida aumentada, y estimulación de la secreción de ácido gástrico y la motilidad. Kojima et al., Trends Endocrinol. Metab. 12:118-122 (2001); Kojima, et al., Physiol. Rev. 85:495-532 (2005). De este modo, además de la diabetes, la grelina acilada es un biomarcador metabólico conocido para condiciones relacionadas, tales como pérdida de peso inducida por la dieta y por el ayuno. Otra forma de péptido de grelina se conoce como des-acil-grelina, que es una forma metabólicamente inactiva que tiene sus propias funciones que incluyen la modulación de la proliferación de células (Balzani, et al., J. Cell Biol. 159:1029 - 37 (2002); Ariyasu, et al., Endocrinol. 2005: 355 - 64 (2005)) y adipogénesis (Muccioli, et al., Eur. J. Pharmacol. 498:27 - 35 (2004)). La concentración en plasma normal de la grelina, incluyendo tanto las formas activa como inactiva, está comprendida entre aproximadamente 300 y aproximadamente 700 pg/ml (o aproximadamente 0,08 y aproximadamente 01,9 nM o aproximadamente 0,09 y aproximadamente 0,19 fmol/μl), y fluctúa con el tiempo. La forma de circulación principal de grelina es dec-acil grelina [Hodosa, et al., Biochim. Biophys. Res. Comm. 279:909-13 (2001)], y de este modo la mayoría de esta cantidad no está en la forma de biomarcador metabólico mas preciso. Una vez en circulación, la grelina tiene una media vida de aproximadamente 30 minutos.

Yi, et al., J. Proteome Res. 6(5):1768-81 (2007), por ejemplo, reporta que la degradación proteolítica de las proteínas del suero y del plasma causada por las proteasas intrínsecas se produce durante los primeros minutos de la extracción y manipulación de la muestra (que sugiere la rápida degradación proteolítica fuera del organismo). En una publicación posterior, Yi et al., J. Proteome Res. 7(12):5112-8 (2008), reporta que aunque el descubrimiento de los marcadores de enfermedades en los fluidos de la sangre continua para acelerar a medida que la terminología de los proteómicos se hace tanto más potente y más ampliamente disponible, ha habido considerablemente menos éxitos en la transición de estos descubrimientos a utilidad clínica, estimulando un interés creciente en el entendimiento de las barreras de esta transición. Aparte de las medias vidas cortas y las concentraciones bastante pequeñas de GLP-1, GIP, glucagon y grelina (y particularmente las formas biológicamente activas de los mismos) en el plasma, surgen complicaciones debido a la variabilidad pre-analítica especialmente durante la extracción de sangre y el manejo temprano de la muestra. Yi (2008) también reporta que en el caso de algunos biomarcadores de péptido, la degradación proteolítica se produce en cuestión de segundos.

La publicación *Direct activation of Ca^{2+} Channels by palmitoyl, carnitine, a putative edogenous ligand* por Michael Spedding et al., Br. J. Pharmacol (1987), 92, 457 - 468, se refiere a la carnitina de palmitol, un metabolito lípido que se acumula en las membranas citoplásmicas durante las isquemia, y que se ha mostrado que se asemeja al activador de canal Ca^{2+} , Bay K 8644, en el músculo liso K^+ -despolarizado.

El documento EP 1 113 269 A2 se refiere a una bandeja, kits y métodos de ensayo, para filtrar fluidos corporales de recién nacido mediante espectrometría de masas en tándem.

La publicación *Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach* by Shanado, Y., et al., Biochem Biophys Res Commun., 24 de Dic de 2004; 325 (4); 1487-94, se refiere a una grelina, descubierta en el estómago de las ratas como una hormona de crecimiento endógena secretagogo, que está octanoilada en el residuo Ser3.

La publicación *Identificación and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase I as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium* por Satou M. et al., Endocrinology, Octubre de 2010; 151(10): 4765-75, se refiere a grelina que contiene ácido octanoico en la tercera serina de residuo, siendo la presencia de ácido octanoico en la glicerina crítica para sus funciones fisiológicas.

M. Satou et al. "Identification and Characterization of Acyl-Protein Thioesterase 1/Lysophospholipase I As a Ghrelin Deacylation/Lysophospholipid Hydrolyzing Enzyme in Fetal Bovine Serum and Conditioned Medium" ENDOCRINOLOGY, (20101001), vol. 151, no. 10, Páginas 4765-4775, se refiere al papel de la actividad del suero de APT1 en la determinación de la concentración de la des-acil grelina en circulación, especialmente bajo inflamación séptica.

SUMARIO DE INVENCION

La materia objeto de la presente invención está definida en las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes se refieren a las realizaciones preferidas.

La grelina contiene un eje central péptido y una cadena lateral que contiene un grupo 8-carbono éster, que es susceptible para las proteasas endógenas y las esterases respetivamente, que están presentes en el plasma humano. Como se muestra en los ejemplos de trabajo, los Solicitantes han descubierto que la grelina puede ser estabilizada de forma más efectiva en las muestras de sangre recogida o en el componente fluido (por ejemplo suero o plasma) mediante la inclusión de un inhibidor de lisofosfolipasa (LisoPLA), opuesto a un inhibidor de proteasa o una esterasa. En efecto, los datos de los Solicitantes muestran que la presencia adicional de un inhibidor de esterasa de estabilidad reducida o disminuida de grelina in vitro. Aparte del hecho de que la cadena lateral de grelina

es un grupo "éster", estos descubrimientos son sorprendentes y no esperados especialmente a la vista de los informes en los que la actividad de LisoPLA es detectada en el estómago e intestino, pero no en el plasma. De este modo, la presente invención ofrece estabilidad de almacenamiento relativamente más larga de la sangre o de un componente de la misma con el fin de realizar ensayos clínicos fiables, tales como la medida de los biomarcadores tales como la grelina.

Por consiguiente, un primer aspecto está dirigido a un dispositivo de extracción para extraer y estabilizar la sangre completa o un componente de la misma, que incluye un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define un depósito, en el que el depósito contiene un agente de estabilización que incluye un inhibidor de lisofosfolipasa (LisoPLA). En algunos ejemplos, el agente de estabilización incluye también al menos un inhibidor de otro tipo de enzima que está normalmente presente en la sangre y que degrada los marcadores de diagnóstico de las enfermedades metabólicas. Estas enzimas incluyen esterases y proteasas. De este modo, en otros ejemplos, el dispositivo de extracción de sangre incluye también un inhibidor de esterasa, tal como una butilcolinesterasa (BChE) o un inhibidor acetilcolinesterasa (AChE), y/o un inhibidor de proteasa (por ejemplo un inhibidor de proteasa serina, un inhibidor de una exopeptidasa, un inhibidor de dipeptidil peptidasa, y combinaciones de dos o más de los mismos).

También se proporcionan métodos de fabricación y utilización de los dispositivos para la finalidad de extraer y almacenar sangre completa o componente(s) de la misma.

Un aspecto más esta dirigido a un método para diagnosticar una enfermedad o monitorizar un tratamiento de un individuo con una enfermedad tal como una enfermedad metabólica (por ejemplo diabetes), que comprende medir a lo largo del tiempo (o al menos en un momento predeterminado a o intervalos de tiempo) la presencia o cantidad de uno o más marcadores para la enfermedad, incluyendo grelina biológicamente activa (metabólicamente) en una muestra de sangre o componente de la misma extraída de un paciente utilizando un dispositivo de extracción de sangre de la invención. En algunos ejemplos, el método incluye también medir al menos un marcador de enfermedad adicional seleccionado de glucagon, GIP, grelina y GLP-1 (que incluye GLP-1-(7-36)NH₂ y GLP-1-(7-37)), y combinaciones de dos o más de los mismos.

Todavía un aspecto más está dirigido a un método para monitorizar niveles en sangre de un profármaco que contiene un grupo lateral de éster alifático (por ejemplo grupo acil) en un individuo al que se le ha administrado el profármaco, que incluye extraer una muestra de sangre del paciente utilizando el dispositivo de extracción de sangre de la invención, y medir la presencia o cantidad del profármaco y/o un metabolito activo del mismo, en la muestra o componente de la misma. La presencia o cantidad del profármaco y de un metabolito activo del profármaco pueden ser medidas. La medida de los niveles en sangre del profármaco y/o el metabolito pueden ser realizados más de una vez, tal como a intervalos de tiempo predeterminados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una vista en perspectiva de un dispositivo de extracción de sangre típico de la presente invención.

La Figura 2 es un gráfico que muestra una comparación de la estabilidad de acil-grelina en 30 horas en cuatro tubos de extracción de sangre diferentes que contienen: 1) el inhibidor LisoPLA metil araquidonil fluorofosfato (MAFP), EDTA, el inhibidor de esterasa, tacrina, y los inhibidores de proteasa, L-treo-isoleucil tiazolidina, bestatina y leupeptina (un agente de estabilización de la invención "ISA", designado en la figura como ▲); 2) otro agente de estabilización de la invención que incluye el anticoagulante EDTA y MAFP (designado en la figura como x); 3) EDTA e inhibidor de esterasa y los inhibidores de proteasa (el agente de estabilización comparativo "CSA" designado en las figuras como ♦) y 4) EDTA solo (designado en la figura como ■) seguido por la adición de una cantidad conocida de 1 pg/uL de acil-grelina.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la estabilidad de la grelina en una muestra de sangre, extraída de un sujeto humano en ayunas, a lo largo del tiempo, y extraída y almacenada tanto en los tubos de EDTA con cantidad añadida conocida (♦) como no añadida (■) y tubos de extracción que contienen un agente de estabilización representativo (que incluye MAFP como inhibidor LisoPLA) de la presente invención (tanto con cantidad conocida añadida (▲) como no añadida (x)).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los dispositivos de extracción de la presente invención se utilizan para extraer y estabilizar la sangre completa o un componente de la misma, tal como concentrados de glóbulos rojos, concentrados de plaquetas, concentrados de leucocitos, y componentes fluidos de sangre que incluyen plasma y suero.

En general, los dispositivos de extracción de muestra de sangre pueden abarcar cualquier dispositivo de extracción que incluya tubos tales como tubos de ensayo y tubos de centrifugación; dispositivos de extracción de sangre de sistema cerrado, tales como bolsas de extracción de sangre; jeringuillas, especialmente jeringuillas prerellenas; catéteres, placas microtituladoras y otras placas de múltiples pocillos; configuraciones, tubos, vasos de laboratorio tales como frascos, matraces agitadores, botellas roller, viales, placas de microscopio, conjunto de placas de microscopio, cubreplacas, películas y sustratos y conjuntos porosos; pipetas y puntas de pipeta; tejido y otros contenedores de extracción de muestras biológicas; y cualquier otro recipiente adecuado para contener una muestra

biológica, así como recipientes y elementos implicados en la transmisión de las muestras. Ejemplos e ilustraciones en tales dispositivos se describen en la Patente de Estados Unidos de propiedad común 7.309.468 concedida a Stevens *et al.*

5 La Figura 1 que está ilustrada también en la Patente de Estados Unidos 7.309.468, muestra un dispositivo de extracción de sangre típico 10, útil para 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, un miembro de separación 13 está dispuesto dentro de la cámara de recipiente 14. El miembro de separación 13 sirve para ayudar a separar los componentes de la muestra de sangre, por ejemplo, mediante centrifugación. El recipiente 12 está dimensionado para recoger un volumen de sangre. Unos medios de cierre 22 para cubrir el extremo abierto 20 para cerrar el recipiente 12 son necesarios cuando se demande un producto estéril. En algunos ejemplos, el tubo está configurado para una tapa de rosca. En los ejemplos en los que el tubo es evacuado, sin embargo, como en el caso en el que el recipiente contiene un inhibidor BChE pero no un inhibidor de proteasa, un tapón elastómero de fijación estanca generalmente empleado para contener el vacío durante los periodos de almacenamiento requeridos. Preferiblemente, el cierre 22 forma una obturación capaz de cerrar de forma efectiva el recipiente 12 y contener una muestra biológica en la cámara 14. El cierre 22 puede ser uno de una variedad de formas que incluyen, pero no se limitan a, cierre de goma, cierres HEMOGUARD™, obturaciones metálicas, obturaciones de goma con bandas de metal, y obturaciones 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 vasos de laboratorio, incluyendo, por ejemplo, plástico (por ejemplo poliolefinas, poliamidas, poliésteres, siliconas, poliuretanos, epoxis, acrílicos, poliacrilatos, polisulfonas, polimetacrilatos, PEEK, poliamida y fluoropolímeros) y productos de vidrio que incluyen cristal de sílice. Preferiblemente, el recipiente 12 es transparente. Ejemplos de materiales termoplásticos transparentes adecuados para el recipiente 12 incluyen policarbonatos, polietileno, polipropileno y polietileno tereftalato. Los materiales plásticos pueden ser materiales impermeables al oxígeno o pueden contener una capa impermeable o semi-impermeable al oxígeno. Alternativamente, el recipiente 12 puede estar hecho de un material plástico impermeable al agua y al aire.

La presión en la cámara 14 está seleccionada para introducir un volumen predeterminado de muestra biológica al interior de la cámara 14. Preferiblemente, el cierre 22 está hecho de un material elástico que es capaz de mantener la diferencia de presión interna entre la presión atmosférica y una presión menor que la atmosférica. El cierre 22 es tal que se puede perforar con una aguja 26 u otra cánula para introducir una muestra biológica en el recipiente 12 como se conoce en la técnica. Preferiblemente el cierre 22 es liberable. 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.

Ejemplos adecuados de recipiente 12 incluyen tubos de pared única o de múltiples paredes. Un ejemplo más específico de un recipiente adecuado 12 se describe en la Patente de Estados Unidos 5.860.937.

El recipiente 12 puede contener también un separador tal como un gel, un separador mecánico u otro tipo de miembro de separación (por ejemplo, papel de filtro o similar). Los separadores son útiles para la preparación de plasma de sangre, específicamente para separar plasma de la sangre humana o de animal completa. El gel es de manera deseable una formulación de gel polimérico tixotrópico. El gel puede ser un homopolímero o un copolímero y puede incluir geles con base de silicona tales como, por ejemplo, polisiloxanos o geles con base de hidrocarburo orgánico tales como por ejemplo, poliacrílicos, poliésteres, poliolefinas, polibutadienos cis oxidados, polibutenos, mezclas de aceite de soja epoxidizado e hidrocarburos clorinados, copolímeros de diácidos y propandioles, ciclopentadienos hidrogenados y copolímeros de alfa-olefinas con dialquilmaleatos. Ejemplos de separadores mecánicos que pueden ser útiles en la presente invención se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 6.516.953; 6.406.671; 6.409.528; y 6.497.325.

El recipiente 12 también puede estar adaptado para separar de forma centrífuga los linfocitos y los monocitos de las fases más pesadas de una muestra de sangre completa. En tales realizaciones, los dispositivos también pueden contener un medio de gradiente de densidad de líquido y unos medios para evitar el mezclado del medio de gradiente de densidad de líquido con una muestra de sangre antes de la centrifugación. Un ejemplo de tubo de extracción de linfocito/monocito adecuado se describe en la Patente de Estados Unidos 5.053.134.

Aparte del ejemplo ilustrado en la Figura 1, otros tubos de extracción de sangre comercialmente disponibles incluyen lo siguiente, todos ellos vendidos por Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes., N.J, con todos los registros y marcas registradas pertenecientes a Becton, Dickinson and Company; tubos de hematología VACUTAINER® (por ejemplo N° en catálogo 367650-1, 367661, 6405, 6385, 6564, 367653, 367665, 367658, 367669, 6450-8, 6535-37 y 367662); tubos K₂EDTA VACUTAINER® (por ejemplo n° de catálogo 367841-2, 367856 y 367861); tubos PST VACUTAINER®, por ejemplo n° de catálogo 367793-4, 6698, 6595 y 6672); tubos CPT VACUTAINER® (por ejemplo n° en catálogo 362753 y 362760-1); tubos SST VACUTAINER®, por ejemplo n° de catálogo 367782-89, 6509-17 y 6590-92); y tubos ACD VACUTAINER® (por ejemplo n° de catálogo 367756, 364012 y 4816), y Tubos Microtainer® BD no evacuados con cierre Microgard™ BD (por ejemplo, 365987, 365965 y 365974) o Tubos Microtainer® BD

convencionales (por ejemplo, 365956, 365957, 365958, 365959, 365971, y 365973). Muchos tubos de extracción de sangre comerciales tienen volúmenes estándar comprendidos típicamente entre 250 microlitros a y que incluyen aproximadamente 10,0 ml, y en algunos casos hasta 16 ml. Volúmenes típicos incluyen 250, 400 y 500 microlitros, así como 200 ml, 3,5 ml, 4,0 ml, 5,0 ml, 8,0 ml, 8,5 ml y 10,0 ml.

En otros ejemplos, el dispositivo puede comprender un depósito integrado dentro de un cartucho de ensayo, el depósito capaz de contener un volumen de sangre completa comprendido entre 2 y 200 microlitros, más preferiblemente 50 - 150 microlitros. Tales cartuchos se venden por ejemplo bajo la marca comercial i-STAT Point de Care System por Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois), y son útiles con un analizador de mano capaz de interactuar con el cartucho. Ejemplos de tales cartuchos y analizadores de mano útiles con la presente invención incluyen el cartucho i-STAT CHEM8+ y el analizador de mano i-STAT® 1 respectivamente. Tales dispositivos se enseñan 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 US D337. 164.

Las lisofosfolipasas (LisoPLA) son enzimas que hidrolizan los lisofosfolípidos (LisoPL) y específicamente en las uniones de éster de ácido carboxílico, que son intermediarios a modo de detergente en el metabolismo de los fosfolípidos y juegan un papel esencial en muchos procesos fisiológicos y patológicos. La lisofosfatidilcolina (LisoPC), un constituyente normal de las membranas de la célula y que se cree que actúa como un mensajero de lípidos, que transforma las señales iniciadas desde los receptores de membrana, es un sustrato endógeno para LisoPLA. El amino ácido y las correspondientes secuencias de ácido nucleico de las LisoPLAs humanas se conocen en la técnica. Véanse por ejemplo las Patentes de Estados Unidos 5.858.756; 6.004.792 and 7.294.496. De acuerdo con una pieza de evidencia presentada en la Patente de Estados Unidos 7.294.496, el mRNA de LisoPLA está ampliamente distribuido en muchos tejidos, con corazón, placenta y músculo del esqueleto que son los más abundantes, seguido del hígado, páncreas, riñón, cerebro y pulmón y en otra pieza de evidencia (que contenía mensajeros de más tejidos), fueron observados patrones similares aunque la intensidad relativa para unos pocos tejidos fue cambiada en que la placenta y los testículos son las fuentes más abundantes para la hLisoPLA seguido pos las glándulas suprarrenal y salivares, hígado, corazón, músculos del esqueleto, y el colon. También se ha reportado que las lisofosfolipasas se producen en numerosas isoformas.

Ejemplos representativos de inhibidores de LisoPLA que pueden ser adecuados para utilizar en la presente invención incluyen etil octilfosfonofluoridato, isopropila dodecilsfosfonofluoridato, n-dodecil-benzodioxafosforina 2-óxido, paltomil carnitina, bromoenol lactona, permitir trifluorometil cetona, y metil araquidionil fluorofosfonato (MAFP). Otros inhibidores pueden ser identificados utilizando métodos de ensayo conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo la Patente de Estados Unidos 7.294.496.

El inhibidor de LisoPLA está presente en el dispositivo de extracción en una cantidad efectiva para estabilizar diversas proteínas endógenas que pueden estar presentes en la muestra biológica, por ejemplo, grelina, y otras proteínas y péptidos que requieren un grupo éster alifático para la actividad biológica. De este modo, aparte de grelina, que es un marcador de enfermedades metabólicas tales como diabetes, los dispositivos de extracción proporcionan la estabilización de otros neuropéptidos. Los inhibidores de LisoPLA funcionan por división de inhibición del grupo éster alifático. La determinación de la cantidad del inhibidor LisoPLA para incluir en el dispositivo de extracción de sangre depende de varios factores que incluyen potencia, solubilidad en agua, el volumen del dispositivo de extracción de sangre, y la naturaleza y extensión de las iteraciones no específicas (por ejemplo debido a la presencia de otras proteínas en la sangre tales como albúmina de suero). Por consiguiente, para los fines de la presente invención, la cantidad del inhibidor de LisoPLA (y las cantidades de agentes de estabilización adicionales se expresa más convenientemente en términos de un rango de concentración (a partir del cual la cantidad real del inhibidor se puede calcular fácilmente). La concentración del inhibidor de LisoPLA generalmente está comprendida entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 10 mM, y en algunas realizaciones entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 1 mM, y en algunas realizaciones entre aproximadamente 100 μM y aproximadamente 1mN (es decir, 10.000.000 nM). También se contemplan todos los subrangos dentro de estos rangos. El término "aproximadamente" como se ha utilizado en combinación con todos los valores de concentración expuestos aquí, se refiere a la variabilidad (valor más/menos) del 50%.

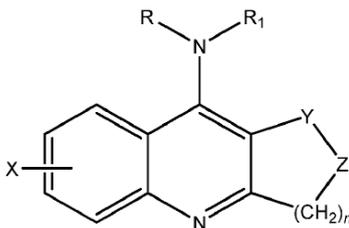
Aunque no se pretende suscribir la teoría, los presentes inventores creen que el inhibidor de LisoPLA puede proporcionar un doble beneficio, consistente en proyectar el grupo de éster alifático procedente de la división por la LisoPLA, proteasas intrínsecas normalmente encontradas en la sangre debería estar dificultada estéricamente de la degradación de la cadena amino ácido del péptido. Dependiendo de tales factores como la naturaleza de analito, el formato de ensayo y el volumen de trabajo (es decir, manejo y almacenamiento de la sangre extraída antes del análisis), los dispositivos de extracción de sangre de la presente invención pueden proporcionar estabilidad de marcadores bioquímicos tales como la grelina durante horas o incluso uno o más días más que los dispositivos similares que no contienen el inhibidos LisoPLA.

En algunos ejemplos, el recipiente de extracción de sangre de la invención puede incluir al menos un agente de estabilización adicional, tal como un inhibidor de una esterasa, por ejemplo carboxiesterasas, tales como butilcolinesterasa y acetilcolinesterasa. Estos agentes de estabilización pueden proporcionar protección adicional contra la degradación fuera del organismo de las proteínas y péptidos que requieren un grupo éster alifático para la

actividad biológica. De este modo aparte de la grelina, que es un marcador de enfermedades metabólicas tales como la diabetes, los inhibidores de esterasa pueden proporcionar estabilización mejorada de otros neuropéptidos. En algunas realizaciones, sin embargo, el agente de estabilización (y el dispositivo como un todo) no incluye un inhibidor de esterasa.

5 La butilcolinesterasa (BChE) (E.C. 3.1.1.8), también conocida como colinesterasa de suero o plasma, se cree que juega un papel en la capacidad del cuerpo para metabolizar la cocaína y otras drogas tales como la succinilcolina y la aspirina. Véase, Lockridge, "Genetic Variants of Human Serum Butyrylcholinesterase influence the metabolism of the muscle relaxant succinylcholine". En, Kalow (ed.) Pharmacogenetics of Drug Metabolism New York: Pergamon Press, Inc, en pp. 15-50. BChE está normalmente presente en el plasma humano en una cantidad de aproximadamente 5 mg/l (o aproximadamente 5 U/ml). Los inhibidores de BChE útiles para la presente invención tienen un valor K_i no mayor de aproximadamente 0,5 μM (500 nM), o en algunas realizaciones un K_i no mayor de aproximadamente 0,05 μM (50 nM), o en todavía otras realizaciones, un K_i no mayor de aproximadamente 0,010 μM (10 nM) (y que incluye todos los subrangos en el mismo). Kis son variables cinéticas (opuestas a las propiedades físicas tales como el peso molecular, puntos de fusión y ebullición, etc.) y como tales pueden estar sometidas a una variación relativamente alta, especialmente dependiendo de la metodología utilizada para determinar este valor. De este modo el término "aproximadamente" como se ha utilizado aquí en combinación con los valores K_i , se refiere a una variabilidad (es decir un valor más/menos) del 50%.

20 Un inhibidor BChE es el compuesto 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina, también conocido como tacrina (y derivados del mismo). Véase la Patente de Estados Unidos 4.816.456. La tacrina es un inhibidor de colinesterasa que actúa centralmente aprobado por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Está registrado por Sciele Pharma bajo la marca registrada COGNEX. Ejemplos representativos de derivados de tacrina que pueden ser adecuados para utilizar en la presente invención se enseñan en la Patente de Estados Unidos 4.754.050, como se muestra en la siguiente fórmula:



30 en donde n es 1, 2 o 3; X es hidrógeno, "loweralkyl", "loweralkoxy", halógeno, hidroxilo, nitro, trifluorometil, MHCOR_2 en donde R_2 es "loweralkyl", o NR_3R_4 en donde R_3 y R_4 son independientemente hidrogeno o "loweralkyl"; R es hidrógeno o "loweralkyl"; R_1 es hidrógeno, "loweralkyl", "diloweralkylaminoloweralkyl", "arylloweralkyl", "diarylloweralkyl", "furilloweralkyl", "thienylloweralkyl", "arylloweralkyl" puenteado con oxígeno, diarylloweralkyl puenteado con oxígeno, "furilloweralkyl" o "thienylloweralkyl" puenteado con oxígeno; Y es $\text{C} = \text{O}$ o CR_5OH en donde R_5 es hidrógeno o loweralquilo; Z es CH_2 o $\text{C} = \text{CR}_6\text{R}_7$, en donde R_6 y R_7 son independientemente hidrógeno o loweralkyl; o Y y Z tomados juntos es $\text{CR}_5 = \text{CH}$ en donde CR_5 y CH corresponden a Y y Z respetivamente; una antípoda óptica de los mismos, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los derivados de tacrina específicos abarcados por esta fórmula incluyen los siguientes:

40 9-Amino-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 9-Amino-3,4-dihidro-6-metilacridina-1(2H)-ona; 9-Amino-3,4-dihidro-6-metoxiacridina-1(2H)-ona; 9-Amino-3,4-dihidro-6-fluoroacridina-1(2H)-ona; 9-Amino-6-cloro-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 9-Amino-7-cloro-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 9-Amino-3,4-dihidro-6-trifluorometilacridina-1(2H)-ona; 9-Amino-3,4-dihidro-7-nitroacridina-1(2H)-ona; 7,9-Diamino-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; N-[9-Amino-3,4-dihidro-1(2H)-oxoacridina-7-il]acetamida; 3,4-Dihidro-9-metilaminoacridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-metilamino-7-nitroacridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-propilaminoacridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-[2-(dimetilamino)etil]aminoacridina-1(2H)-ona; 9-Benzilamino-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 9-Benzilamino-3,4-dihidro-6-metilacridina-1(2H)-ona; 9-Benzilamino-3,4-dihidro-6-fluoroacridina-1(2H)-ona; 9-Benzilamino-6-cloro-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 9-Benzilamino-3,4-dihidro-6-trifluorometilacridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(2-metilbenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(3-metilbenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(4-metilbenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(2-metoxibenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(3-metoxibenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(4-metoxibenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(2-fluorobenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(3-fluorobenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(4-fluorobenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 6-Chloro-3,4-dihidro-9-(4-fluorobenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 9-(2-Clorobenzilamino)-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 9-(3-Clorobenzolamino)-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 9-(4-Clorobenzilamino)-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-[(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)amino]acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(2-

trifluorometilbenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-6-fluoro-9-(2-trifluorometilbenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(3-trifluorometilbenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(4-trifluorometilbenzilamino)acridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-fenetilaminoacridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(4,4-difenilbutil)aminoacridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(4,4-difenilbutilamino)-6-trifluorometilacridina-1(2H)-ona; 9-[4,4-Bis(3-fluorofenil)butilamino]-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 9-[4,4-bis(4-fluorofenil)butilamino]-3,4-Dihidroacridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-(3-fenoxipropilamino)acridina-1(2H)-ona; 9-[2-[Bis(4-fluorofenil)metoxi]etilamino-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 9-[4-(Benziloxi)benzilamino]-3,4-dihidroacridina-1(2H)-ona; 3,4-Dihidro-9-[(2-tienil)metilamino]acridina-1(2H)-ona; 9-Amino-2,3-dihidro-ciclopenta[b]quinolina-1-ona; 9-Amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Amino-6-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Amino-7-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Amino-6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Amino-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Amino-1,2,3,4-tetrahidro-6-trifluorometilacridina-1-ol; 9-Metilamino-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Propilamino-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-[2-(Dimetilamino)etil]amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Benzilamino-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Benzolamino-6-metil-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Benzilamino-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Benzilamino-6-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Benzilamino-1,2,3,4-tetrahidro-6-trifluorometilacridina-1-ol; 9-(2-Metilbenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(3-Metilbenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(4-Metilbenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(2-Metoxobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(3-Metoxobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(4-Metoxobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(2-Fluorobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(3-Fluorobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(4-Fluorobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 6-Cloro-9-(4-fluorobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(2-Clorobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(3-Clorobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(4-Clorobenzilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 1,2,3,4-Tetrahidro-9-(2-trifluorometilbenzilamino)aminoacridina-1-ol; 6-Fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-9-(2-trifluorometilbenzilamino)acridina-1-ol; 1,2,3,4-Tetrahidro-9-(4-trifluorometilbenzilamino)acridina-1-ol; 9-[(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzil)amino]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Fenetilamino-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(4,4-Difenilbutil)amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-[4,4-Bis(3-fluorofenil)butilamino]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-[4,4-Bis(4-fluorofenil)butilamino]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-(3-Phenoxipropilamino)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-[[2-[Bis(4-fluorofenil)metoxi]etil]amino]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-[4-(Benziloxi)benzilamino]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-[(2-Tienil)metilamino]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Amino-3,4-dihidroacridina; 9-Amino-1-metil-1,2,3,4-tetrahidroacridina-1-ol; 9-Amino-3,4-dihidro-2-metileneacridina-1(2H)-ona; Amino-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]quinolina-1-ol; 2-(3-Oxoclohexen-1-il)aminobenzonitrilo; y 4-Cloro-2-(3-oxoclohexen-1-il)aminobenzonitrilo.

Otros inhibidores de butirilcolinesterasa que pueden ser: adecuados para utilizar en la presente invención incluyen dímeros de tacrina tales como etopropazina, (es decir, N,N,N-dietyl-a-metil-IOH-fenotiazina-10-ethanamine; 10-(2-dietilamino-2-metiletil)fenotiazina; o fenopropazina), y derivados de los mismos. Véase, por ejemplo las patentes de Estados Unidos 2.607.773 and 4.833.138. Etopropazina, sal de hidrocloreto, ha sido aprobada por la FDA para utilizar en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Todavía otros inhibidores de butirilcolinesterasa incluyen híbridos de tacrina y (-)-huperzina A (que es un alcaloide de licodina enantiomérico aislado del musgo de trébol *Huperzia serrata* de las especies *Lycopodium*, *Huperziaceae*). Ejemplos de híbridos de Huperzina A-tacrina se conocen en la técnica como compuestos 5a, 5b y 5c, y Huprina X. Sus correspondientes nombres químicos son los siguientes:

((9E)-N1-(7-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ilamino)heptil)-9-etilideno-4,4,7-trimetilbicyclo[3.3.1]non-6-eno-1,3-diamina) (5a); ((9E) -N1-(7-(1, 2, 3, 4-tetrahidroacridina-9-ilamino)heptil) -9-etilideno-4,7-metilbicyclo [3 .3 .1] non-6-eno-1, 3-diamina) (5b); ((9E) -N1-(7-(1, 2, 3, 4-tetrahidroacridina-9-ilamino)heptilamino) -9-etilideno-3-metilbicyclo [3 .3 .1] non-3-eno-1-carboxílico Ácido Metil Ester) (5c); y (1S) -7-cloro-15-etil-10-azatetracyclo [II .3 .1. 0A {2, 11}. 0 ^ {4, 9}] heptadeca-2(11),3,5,7,9,14-hexaen-3-amina)(Huprina X). Métodos de sintetización de estos componentes se describen el Gemma, et al., J. Med. Chem. 49(11): 3421-25 (2006) (5a, 5b and 5c), y Camps, et al., Mol. Pharmacol. 57:409-17 (2000) (Huprine X).

La concentración de BChE generalmente está comprendida entre aproximadamente 5 μM y aproximadamente 500 mM (es decir, 5×10^8 nM), y en algunas realizaciones rangos comprendidos ente aproximadamente 0,5 μM y aproximadamente 50 mM, y en todavía otras realizaciones, entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 10 mM. También se contemplan todos los subrangos dentro de estos rangos. Como en el caso de los valores K_i , el término "aproximadamente" como se ha utilizado en combinación con todos los valores de concentración descritos aquí, se refiere a una variabilidad (valor más/menos) del 50%.

El agente de estabilización también puede incluir un inhibidor de otro tipo de esterasa de suero, y específicamente un inhibidor de otra B-esterasa (de la que BChE es un miembro). Estas esterases incluyen acetilcolinesterasa (AChE) (EC3.1.1.7) y carboxilesterasa no específica (EC 3.1.1.1). Inhibidores de AChE actúan sobre la colinesterasa y la inhiben de romper la acetilcolina que funciona en el cuerpo como un neurotransmisor. Algunos inhibidores de BChE tales como tacrina y huperzina A se sabe que inhiben la acetilcolinesterasa también. La tacrina tiene un K_i reportado para AChE de 6,9 nM (Bencharit, et al., Chem. Biol. 10:341-9 (2003)). La huperzina A

tiene un Ki reportado para AChE de 47 nm (Gemma, et al., J. Med. Chem. 49: 3421-5 (2006)). Dado que BChE constituye una parte significativa de la actividad de esterasa total en el suero humano (es decir, aproximadamente 5 mg/L de BChE comparado con 0,008 mg/L para AChE), la inclusión de inhibidores en el tubo de extracción de sangre es opcional.

Los Kis de los inhibidores de AChE adecuados son típicamente aproximadamente 500 nm o menos, y en otras realizaciones, menos de aproximadamente 400 nm, 300 nm, 200 nm, 100 nm, 50 nm o 10 nm. Como se ha expuesto aquí, los valores Ki de para un inhibidor de AChE dado se pueden determinar de acuerdo con técnicas de ensayo estándar.

De este modo otros inhibidores de AChE incluyen los siguientes:

Huprina X ((1S)-7-coloro-15-etil-10-azatetraciclo[11.3.1.0^{2,1}.0^{4,9}] heptadeca-2(11),3,5,7,9,14-hexaen-3-amina) (Ki de 0,026 nm); Dímero de Tacrina 4a (methilbis[3-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ylamino)propil]amino)etan-1-ol | N,N-Bis[3-[(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-yl)amino]propil]-N-hidroxiethylamina) (Ki de 0,65 nm); Derivativo de Tacrina 2 (6,8-dicloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 1,0 nm); Dímero de Tacrina 3b Análogo de Tacrina Homodimérica 3b | N-[7-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ylamino)heptil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino | compuesto 3a homobivalente de tacrina) (Ki de 1,3 nm); Dímero de Tacrina 4c (N,N-Bis[3-[(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-yl)amino]propil]-N-allilamina | prop-2-en-1-ilbis[3-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ylamino)propil]amina) (Ki de 1,6 nm); Dímero de Tacrina 3c (Análogo de tacrina Homodimérico 3c | N-[8-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ylamino)octil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 1,9 nm); Dímero de Tacrina 4b (N,N-Bis[3-[(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-yl)amino]propil]-N-etilamina | etilbis[3-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ylamino)propil]amina) (Ki de 2,8 nm); compuesto 3c heretobivalente de tacrina (N-[7-[(6,8-dicloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-yl)amino]heptil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 6,0 nm); Híbrido 5c de Huperzina A-Tacrina ((9E)-7-(7-(1,2,3,4-Tetrahidroacridina-9-ylamino)heptilamino)-9-etilideno-3-metilbencilo[3.3.1]non-3-eno-1- Acido Metil Ester carboxílico | metil (1S)-9-etilideno-3-metil-7-[(7-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ylamino)heptil]amino)bencilo[3.3.1]non-3-eno-1-carboxilato) (Ki de 6,4 nm); Dímero de Tacrina 4j (N-Metil-N-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-yl)-N-[3-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ilsulfanil)propil]-1,3-propanodiamina | metil [3-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ylamino)propil] [3-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ilsulfanil)propil]amino) (Ki de 9,1 nm); Híbrido 5b de Huperzina A-Tacrina ((9E)-N1-(7-(1,2,3,4-Tetrahidroacridina-9-ylamino)heptil)-9-etilideno-7-metilbencilo[3.3.1]non-6-eno-1,3-diamina | N-(7-[(1S)-1-amino-9-etilideno-7-metilbencilo[3.3.1]non-6-en-3-yl]amino)heptil)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 15,70 nm); Híbrido 5a de Huperzina A-Tacrina (9E)-N1-(7-(1,2,3,4-Tetrahidroacridina-9-ylamino)heptil)-9-etilideno-4,4,7-trimetilbencilo[3.3.1]non-6-eno-1,3-diamina | N-(7-[(1S)-1-amino-9-etilideno-4,4,7-trimetilbencilo[3.3.1]non-6-en-3-yl]amino)heptil)-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 16,50 nm); AP2238 3-(4-[[benzil(metil)amino]metil]fenil)-6,7-dimetoxi-2H-2-cromonona | 3-(4-[[benzil(metil)amino]metil]fenil)-6,7-dimetoxi-2H-cromon-2-ona) (Ki de 21,70 nm); Dímero de Tacrina 4i (N-(1,2,3,4-Tetrahidroacridina-9-yl)-N-[8-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-yl)oct-1-yl]amina | N-[8-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-yl)octil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 30 nm); compuesto 3g heterobivalente de tacrina (6,8-dicloro-N-[7-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ilsulfanil)heptil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 41 nm); Dímero de Tacrina 4m (N-[3-(1,2,3,4-Tetrahidroacridina-9-ylamino)propil]-N-[4-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ilsulfanil)butil]acetamida) (Ki de 47 nm); 9-Amino-6-Cloro-2-Metoxiacridina (6-cloro-2-metoxiacridina-9-amino) (Ki de 49 nm); Dímero de Tacrina 4k (N-[3-(1,2,3,4-Tetrahidroacridina-9-ylamino)propil]-N-[3-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ilsulfanil)propil]acetamida) (Ki de 50 nm); compuesto 3i heterobivalente de tacrina (N-[6-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ilsulfanil)hexil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 100 nm); compuesto 3b homobivalente de tacrina (6,8-dicloro-N-[7-[(6,8-dicloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-yl)amino]heptil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 150 nm); Dímero de Tacrina 3a (N-[5-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ylamino)pentil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 210 nm); Dímero de Tacrina 4g (N-[8-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ilsulfanil)octil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 250 nm); compuesto 3f heterobivalente de tacrina (N-[7-[(6,8-dicloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-yl)heptil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) (Ki de 290 nm); 1,2-Compuesto con base de diona, 8 (1,2-dihidronaftaleno-1,2-diona | 1,2-naftoquinona) (Ki de 320 nm); Dímero de Tacrina 4f (N-[7-(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-ilsulfanil)heptil]-1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-amino) | compuesto 3e heterobivalente de tacrina Ki de 340 nm); y 6,9-Diamino-2-Etoxiacridina (7-etoxiacridina-3,9-diamina) (Ki de 490 nm). Los valores Ki descritos aquí para los inhibidores de AChE anteriormente mencionados están reportados en Gemma, et al., J. Med. Chem. 49:3421-5 (2006); Carnpiani, et al., J. Med. Chem. 48: 1919-29 005); Wong, et al., J. Am. Chem. Soc. 125:363-73 (2003); Savini, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 11: 177 9-8 2 (2001); Piazzzi, et al., J. Med. Chem. 46:2279-82 (2003); Bencharit, supra.; and Hyatt, et al., J. Med. Chem. 50:5727-34(2007).

Ejemplos adicionales de inhibidores de AChE incluyen los siguientes: organofosfatos (por ejemplo, Mefonato, Ecotiofato, fluorofosfatos de diisopropil, Ciclosarín, Dimetoato, Sarín, Soman, Tabun, VX, VE, VG, VM, Diazinon, Malation y Paration); carbamatos (por ejemplo, Fisostigmina, Neostigmina, Piridostigmina, Ambenonio, Demarcario, Rivastigmina, Aldicarb, Bendiocarb, Bufencarb, Carbaril, Carbendazima, Carbetamina, Carbofuran, Clorbutam, Clorprofam, Etiofencarb, Formetanato, Metiocarb, Metormil, Oxamil, Fenmedifam, Pinmicarb, Pirimicarb,

Propamocarb, Profam y Propoxur); derivados de Penantreno (por ejemplo, galantamina); piperidinas (por ejemplo, Donepezil (E2020) (K_i de 2.9 nm)); Edrofonio; y compuestos naturales (por ejemplo, galantamina y Onchidal).

5 Dado que algunos inhibidores BChE también presentan una potente actividad inhibidora de AChE, los ejemplos de la presente invención incluyen un único inhibidor de esterasa que posee tanto actividades inhibitorias de BChE como de AChE.

10 La concentración de inhibidor de esterasa adicional que puede estar presente en el dispositivo de extracción de sangre generalmente está comprendida entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 70 mM, y en algunos ejemplos, entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 7 mM.

15 El agente de estabilización también puede incluir un inhibidor de proteasa. Los inhibidores de proteasa presentan actividad inhibidora contra una o más clases de proteasas que incluyen, por ejemplo proteasas de serina, exopeptidasas y dipeptidil peptidasas. De este modo, el dispositivo puede contener un coctel de dos o más de tales inhibidores incluyendo, por ejemplo, un inhibidor de proteasa de serina y un inhibidor de una exopeptidasa, un inhibidor de una proteasa de serina y un inhibidor de una dipeptidil peptidasa, y un inhibidor de una proteasa de serina, un inhibidor de dipeptidil peptidasa. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 7.309.468 concedida a Stevens, et al.

20 Ejemplos representativos de inhibidores de proteasa de serina incluyen antipaina, aprotinina, antitrombina, quimostatina, DFP, elastatinal, APMSF, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), AEBSF, TLCK, TPCK, leupeptina, tripsina e inhibidor de tripsina de soja. Concentraciones de inhibidores de proteasa de serina están generalmente comprendidas entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 100 μM.

25 Ejemplos representativos de inhibidores de exopeptidasa incluyen amastatina, bestatina, diprotina A and diprotina B. las concentraciones de inhibidores de exopeptidasa generalmente están comprendidas entre 0,01 mM y aproximadamente 1 mM.

30 La actividad de dipeptidil peptidasa (que incluye actividades DPP-IV y similares a DPP-IV) presentes en la circulación es altamente específica en la liberación de dipéptidos del extremo N-terminal de los péptidos biológicamente activos con prolina o alanina en la penúltima posición de la secuencia N-terminal del sustrato péptido. Los polipéptidos insulínotropicos dependientes de glucosa GI P₁₋₄₂ y GLP-1₇₋₃₆, potencian la secreción de insulina inducida por la glucosa desde el páncreas (incretinas), son sustratos de DPP-IV. La enzima DPP-IV libera los dipéptidos tirosinil-alanina y histidil-alanina, respetivamente, de los N-terminales de estos péptidos tanto *in vitro* como *in vivo*. Mentlein, et al., Eur. J. Biochem. 214, 829 (1993). Ejemplos representativos de inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) incluyen vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina y alogliptina. Otros inhibidores de DPP-IV incluyen compuestos de dipéptido formados a partir de un aminoácido tal como la isoleucina, Asn, Asp, Glu, His, Pro y Val, y un grupo tiazolidina o pirrolidina, y esteroisómeros, por ejemplo, formas L-tero y L-alo de los mismos, y sales inorgánicas y orgánicas de los mismo (por ejemplo, fosfato, sulfato, acetato, tartarato, succinato y fumarato). Ejemplos específicos de los compuestos de dipéptido incluyen L-treo-isoleucil tiazolidina, L-alo-isoleucil tiazolidina, L-treo-isoleucil pirrolidida, y L-alo-isoleucil pirrolidida. Concentraciones de inhibidor de dipeptidil peptidasa están generalmente comprendidas entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 1 mM.

45 El agente de estabilización puede contener además inhibidores de otras clases de proteasas. De este modo, en ejemplos adicionales, los dispositivos de extracción de sangre también pueden contener un inhibidor de una proteasa de cisterina (por ejemplo IAA (ácido indolacético) y E-64), una proteasa de serina/cisterina (por ejemplo. leupeptina, TPCK, PLCK-HCL, 2- heptanona-HCL, y antipain-HCl), una proteasa arpática (por ejemplo, pepstatina y VdLPFFVdL), una metaloproteasa (por ejemplo, EDTA, bestatina, 1, 10-phenanthroline y fosforamodon), una tiol proteasa, una proteasa aspártica/calpaina (por ejemplo, pepstatina, N-acetil-leu-leu-norleucinal y N-acetil-leu-leu-metioninal), una caspasa, una endopeptidasa (por ejemplo, α₂-macroglobulina (referido como un inhibidor de endopeptidasa universal), α₁-anti-tripsina y tiorfan), y combinaciones de dos o más de los mismos. Ejemplos adicionales de inhibidores de proteasas incluyen inhibidor de tripsina de soja y judía, inhibidora de proteasa pancreática, ovostatina blanca de huevo y cistatina blanca de huevo. Los expertos en el campo de los proteómicos apreciarán que un inhibidor dado puede presentar actividad inhibidora contra una o más proteasas en la misma clase de proteasas, así como una actividad inhibidora contra una o más proteasas de diferentes clases de proteasas. La bestatina y la amastatina, por ejemplo, presentan actividad inhibidora contra las metaloproteasas así como contra las exopeptidasas.

60 Ejemplos que emplean una pluralidad de agentes de estabilización, por ejemplo, además de un inhibidor de LisoPLA, un inhibidor de proteasas, o un inhibidor de BChE y un inhibidor de proteasa), también están referidos aquí como un cóctel de agentes de estabilización.

65 El agente de estabilización puede estar presente en cualquier forma adecuada, incluyendo líquidos (por ejemplo, soluciones y suspensiones) y sólidos (por ejemplo pelets, tabletas, cápsulas, material secado por rociado, material secado por congelación, polvo, partículas, cristales y materiales liofilizado) y semi-sólidos (por ejemplo gel). La liofilización puede ser particularmente útil ya que proporciona buena estabilidad (por ejemplo, en términos de

maximizar la propia vida del agente de estabilización) y también permite la posterior esterilización. Por ejemplo, el agente estabilizante puede ser introducido en el recipiente del dispositivo en forma de una composición líquida, y después ser liofilizado mediante técnicas estándar. El secado por congelación, por ejemplo, implica la congelación de la composición líquida y después el calentamiento lento después de la congelación a la vez que se aplica simultáneamente un vacío, de manera que un polvo secado con congelación permanece en el dispositivo de extracción. Se pueden añadir diversos aditivos tales como PVP o trehalosa a la composición líquida antes del secado por congelación para facilitar la formación de pelets del agente de estabilización y la reconstrucción de los agentes liofilizados después del contacto con la sangre. También se puede utilizar el secado por vacío después de añadir la composición líquida. En otras realizaciones, el agente de estabilización está formado en un líquido o aerosol sólido, y es rociado sobre una o más superficies del interior de recipiente. La encapsulación o formulación del agente de estabilización en forma de pastilla lo protege de la exposición a la luz y evita otras interacciones indeseables entre los inhibidores y otros elementos en el recipiente. Los materiales de encapsulación y excipientes útiles en la fabricación de pastillas y cápsulas que se disuelven en la extracción de la muestra son bien conocidos en la técnica.

Además de estar dispuesto en el depósito, el agente de estabilización puede estar situado en cualquier superficie del dispositivo de extracción que entre en contacto con la sangre extraída. Por ejemplo, el agente de estabilización puede estar también situado en tapones y obturaciones para cerrar el dispositivo, o en elementos mecánicos, u otros insertos situados dentro del dispositivo.

Además del agente de estabilización, el dispositivo a modo de ejemplo también puede contener un medio portador (por ejemplo, agua o alcohol), medios de estabilización o reconstrucción (por ejemplo, polivinilpirrolidona, trehalosa, manitol, etc.) y/o uno o más de otros aditivos para tratar la muestra biológica. Los aditivos típicos incluyen fenol, mezclas de fenol/cloroformo, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, sales de ácidos orgánicos, sales de metal de álcalis de haluros, agentes de quelatización orgánica, tintes fluorescentes, anticuerpos, agentes ligantes, anticoagulantes tales como citrato de sodio, heparina, EDTA y sus sales (por ejemplo, EDTA de potasio), antioxidantes, agentes reductores y agentes amortiguadores. Preferiblemente, el portador y los aditivos no degradan las proteínas. Cuando los inhibidores están en forma de pastilla, pueden ser incluidos materiales de desintegración de pastilla farmacéuticos, que son conocidos en la técnica, si se desea.

Un proceso de fabricación útil para un dispositivo implica obtener un recipiente de extracción, tal como un tubo; añadir el agente de estabilización (por ejemplo un inhibidor de LisoPLA y un inhibidor de proteasa) al recipiente; liofilizar los inhibidores; evacuar el recipiente; y esterilizar el recipiente. Se puede añadir un miembro de separación al recipiente, si se desea. Un ejemplo de proceso de liofilización/evacuación adecuado es como sigue: el recipiente es congelado a una temperatura de aproximadamente $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una presión de aproximadamente 760 mm durante aproximadamente 6 a 8 horas; el recipiente se seca a una temperatura creciente de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, a una presión de aproximadamente 0,05 mm, durante aproximadamente 8 a 10 horas; y el recipiente es entonces evacuado a una temperatura de aproximadamente $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a una presión de aproximadamente 120 mm durante aproximadamente 0,1 horas. Preferiblemente, la técnica de esterilización es con radiación de cobalto 60.

La sangre completa o componente(s) de la misma pueden ser extraídos del paciente directamente al interior de un dispositivo de extracción de sangre sin ninguna etapa de proceso interviniente. Se ha encontrado que la extracción de la sangre completa directamente del paciente, y la introducción de la muestra directamente en el dispositivo que contiene el agente de estabilización evita de manera sustancial la degradación y/o fragmentación de las proteínas que de otro modo se produciría cuando la muestra es almacenada antes de combinarla con el agente de estabilización. El método de la presente invención es útil tanto con dispositivos de extracción abiertos como con dispositivos de extracción cerrados, en los que la abertura está cerrada mediante medios de cierre.

En un ejemplo preferido, el dispositivo de extracción es un tubo que se utiliza para extraer una muestra de sangre completa directamente de un paciente para estabilizar las proteínas inmediatamente en el punto de extracción. El tubo de extracción puede ser un sistema evacuado para la extracción de sangre. Alternativamente, el tubo puede ser un sistema parcialmente evacuado o no evacuado para la extracción de sangre. Un ejemplo adecuado de un sistema evacuado es un tubo cerrado. Una extracción de jeringuilla manual es un ejemplo adecuado tanto de sistema, parcialmente evacuado como no evacuado. Los sistemas no evacuados también pueden incluir sistemas de extracción automáticos. Son particularmente preferidos los sistemas evacuados.

Los dispositivos de extracción de sangre son particularmente adecuados para estabilizar las proteínas que contienen cadenas laterales de éster alifático, tales como grelina, y en las realizaciones que incluyen un inhibidor de proteasas, biomarcadores de proteína adicionales de enfermedades, por ejemplo GLP-1, GIP y glucagon, que son biomarcadores para enfermedades metabólicas, tales como la diabetes. De este modo, los dispositivos de extracción se pueden utilizar para proporcionar estándares fiables en los que se facilite el diseño de ensayos tales como ELISA que permitirá la detección de estas proteínas en el rango de 10^{-9} - 10^{-11} M, que incluye niveles de circulación de estas proteínas en individuos sanos así como niveles terapéuticos. De este modo, además de los métodos para el diagnóstico de una enfermedad, tales como un desorden metabólico (en donde los niveles elevados del marcador con relación a un control (tal como el criterio médico establecido y/o un rango de concentración derivado de la población estadísticamente significativa de donantes no patológicos) es indicativo de la presencia de

una enfermedad), pueden permitir los métodos para terapia de monitorización en un paciente que padece enfermedades tales como desordenes metabólicos, en donde la normalización (o una tendencia hacia la normalización) de las cantidades de estas proteínas es indicativa de terapia exitosa.

5 Los dispositivos de extracción de sangre también pueden ser utilizados para los fines de extraer y almacenar sangre de los pacientes que han ingerido profármacos que son asociados (también denominados aquí como profármacos que soportan cadenas laterales de éster alifático), para fines terapéuticos, por ejemplo como parte de un régimen de tratamiento para una enfermedad o condición inflamatoria. Se entiende generalmente por profármaco un agente de fármaco activo que realmente es una forma precursora de un fármaco que es terapéuticamente inactivo o
10 significativamente menos activo que la mitad activa del agente (que puede ser un metabolito). Después de la administración tal como la ingestión oral, muchos profármacos se convierten en el fármaco/metabolito activos mediante la división del la unión éster a través de las lisofosfolipasas intrínsecas. Por ejemplo enalapril se convierte en el metabolito activo enalaprilat, y el profármaco valaciclovir se convierte en el fármaco/metabolito activo aciclovir. La heroína es desacetilizada al fármaco/metabolito activo morfina. En ajustes clínicos, y en particular en pruebas clínicas, es ventajoso monitorizar los niveles de sangre del profármaco así como del metabolito activo en pacientes en el transcurso del tiempo, por ejemplo, desde uno o más de los puntos de vista de seguridad, eficacia, bioactividad y bioequivalencia.

Por ejemplo, en estudios de bioactividad, que miden la velocidad y extensión a la que el ingrediente activo o mitad activa es absorbida de un producto de fármaco y se hace disponible en el sitio de acción, se recomienda que la concentración y actividad tanto del fármaco padre como del metabolito sean determinadas. En estudios de bioequivalencia (que estudian la extensión de la diferencia de velocidad y extensión a la que el ingrediente o mitad activa en los equivalentes farmacéuticos o alternativas se hacen disponibles en el sitio de la acción de fármaco cuando se administra en la misma dosis molar bajo condiciones similares), medida de la forma padre profármaco) es generalmente recomendada (excepto en situaciones en las que los niveles de fármaco padre son demasiado bajos para permitir la medida analítica fiable en la sangre, suero o plasma para una duración adecuada de tiempo, o cuando el metabolito contribuye significativamente a la seguridad y/o eficacia, en cuyos casos, se miden la concentración y actividad tanto del profármaco como del metabolito).

El análisis cualitativo o cuantitativo de la sangre extraída de los pacientes que han sido sometidos a tal terapia (que incluye pacientes que actualmente están sometidos a tal terapia) utilizando los dispositivos de extracción de sangre de la invención aumenta la precisión de cualquiera de tales análisis ya que la degradación de esterasa catalizada fuera del organismo del profármaco en la sangre extraída se inhibe durante el almacenamiento. El procesamiento de las muestras de sangre, por ejemplo, la extracción del plasma de la sangre extraída, y la separación del profármaco y el metabolito activo, y la posterior medida de estas entidades se puede realizar de acuerdo con técnicas estándar. Por ejemplo, el profármaco y el metabolito activos se pueden separar por HPLC de fase inversa. La detección de presencia o cantidades relativas de profármaco y metabolito activos puede ser realizada de acuerdo con técnicas estándar, tales como espectrometría de masas, seguidas del análisis de los resultados, por ejemplo, regresión cuadrática ponderada o lineal. Véase, por ejemplo, Wiltshire, et al., J. Chromatogr. B745:373-88 (2000) (y las referencias citadas aquí). Los controles a los que los valores medidos se pueden comparar incluyen calibración y muestras de control de calidad (referidas como curvas de calibración *in Wiltshire, supra*).

A continuación se describirán los siguientes ejemplos no limitativos. A menos que se indique lo contrario, todas las partes y porcentajes están referidos al peso.

45 EJEMPLO 1 - ESTABILIDAD COMPARATIVA DE GRELINA EN MUESTRAS DE PLASMA

Se extrajo sangre en 4 tubos separados que contenían 1) el inhibidor de LisoPLA metil araquidonil fluorofosfonato (MAFP), EDTA, el inhibidor de esterasa, tacrina, y los inhibidores de proteasa L-treo-isoleucil tiazolidina, bestatina y leupeptina (un agente de estabilización de la invención "ISA" designados en la figura como ▲), 2) otro agente de estabilización de la invención que incluye el anticoagulante EDTA y MAFP (designado en la figura como x), 3) EDTA y el inhibidor de esterasa y los inhibidores de proteasa (el agente de estabilización comparativo "CSA" designado en la figura como ♦) y 4) EDTA solo (designado en la figura como ■), seguido de la adición de cantidad conocida de 1 pg/uL acil-grelina. Todos los cuatro tubos fueron extraídos indirectamente del mismo sujeto para este experimento y procesados de idéntica manera. Los datos ilustrados en la Figura 2 indican claramente que en los tubos 3 y 4 la acil-grelina se degradaba con el tiempo. Sin embargo, los dos tubos (nº 1 y 2) que contenían MAFP mostraban estabilización en las 30 horas de tiempo de incubación de plasma. El tubo 2, que contenía MAFP y EDTA, superó al tubo 1 que contenía en inhibidor de esterasa y los inhibidores de proteasa.

En un experimento separado, la sangre fue extraída de un sujeto en ayunas en EDTA y EDTA + MAFP. La concentración del tubo de MAFP final en este experimento fue de 0,1 mM, El plasma fue separado de cada tubo en dos viales separados. A un vial se le añadió 1 pg/uL de grelina mientras que al otro no se le añadió. El plasma añadido y no añadido procedente tanto de EDTA como de EDTA + MAFP fueron incubados a temperatura ambiente durante 4 horas. La Figura 3 muestra los niveles de grelina medidos a intervalos de tiempo específicos. Los datos claramente demuestran mayor estabilidad de acil-grelina e los tubos que contienen MAFP.

Todas las publicaciones de patente y publicaciones no de patente son indicativas del nivel de aptitudes de los

expertos en la técnica a la que esta invención pertenece.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo de extracción para extraer y estabilizar sangre completa o un componente de la misma, que comprende un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define un depósito y en el que el depósito comprende un agente de estabilización, un inhibidor de lisofosfolipasa (LisoPLA) y un anticoagulante, en el que el dispositivo es un tubo al menos parcialmente evacuado y comprende además un cierre perforable por una aguja para suministrar la sangre al depósito.
- 10 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el tubo es estéril.
3. El dispositivo de la reivindicación 1 a 2, en el que el inhibidor de LisoPLa es seleccionando del grupo que comprende bromoenol lactona, etil octilfosfonofluoridato, isopropil dodecilsfosfonofluoridato, n-dodecil-benzodioxafosforina 2-oxido, palmitil trifluorometil cetona, palmitoil carnitina y araquidronil fluorofosfonato (MAFP).
- 15 4. El dispositivo de la reivindicación 1 o 3, en el que el agente de estabilización comprende además un inhibidor de proteasa.
5. El dispositivo de la reivindicación 4, en el que el inhibidor de proteasa es un inhibidor de una proteasa de serina, un inhibidor de una endoproteasa, un inhibidor de una exoproteasa, un inhibidor de una dipeptidil peptidasa, o una combinación de dos o más de los mismos.
- 20 6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente anticoagulante es EDTA o una sal del mismo, o heparina.
- 25 7. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticoagulante está revestido o secado por rociado sobre al menos una parte de la pared interior.
- 30 8. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el agente de estabilización comprende además un inhibidor de esterasa seleccionado del grupo formado por inhibidor de butil colinesterasa (BChE), inhibidor de acetil colinesterasa (AChE), y una combinación de los mismos.
9. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la pared interior puede estar compuesta de plástico o cristal.
- 35 10. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el agente de estabilización puede estar liofilizado.
- 40 11. El uso de un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para extraer y estabilizar sangre completa o un componente de la misma de un paciente.
12. El uso de la reivindicación 11, en el que el paciente es un paciente con diabetes y en donde el componente es plasma, grelina, glucagon, $GIP_{(1-42)}$, $GLP-1-(7-36)NH_2$, $GLP-1-(7-37)$, o una combinación de dos o más de los mismos.
- 45 13. El uso de un dispositivo de extracción de sangre de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para diagnosticar una enfermedad metabólica o para monitorizar el tratamiento de un paciente con una enfermedad metabólica midiendo al menos en un momento predeterminado la presencia o cantidad de grelina en una muestra de sangre o en un componente de la misma, que es extraída de un paciente al interior de un dispositivo de extracción, en donde una cantidad medida mayor que un control es indicativa de la presencia de una enfermedad metabólica, o de la eficacia de la terapia.
- 50 14. El uso de un dispositivo de extracción de sangre de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para detectar la presencia o cantidad de un profármaco y/o un metabolito activo del mismo en sangre o en un componente fluido de la misma, que es extraída de un paciente al que se le ha administrado el profármaco, al interior del dispositivo, mediante la detección de la presencia o midiendo la cantidad de un profármaco que soporta un grupo éster alifático en la muestra y comparando la presencia detectada o cantidad medida con un control.
- 55

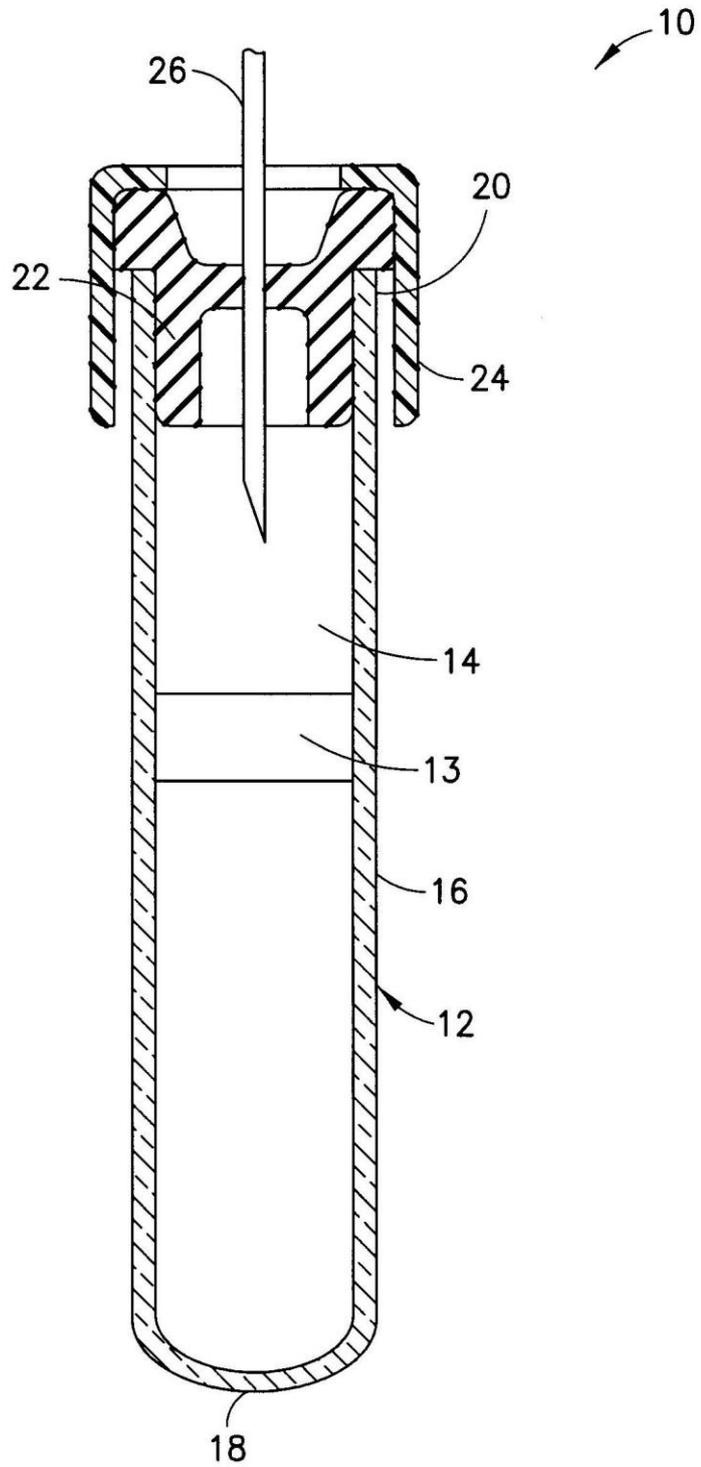


FIG. 1

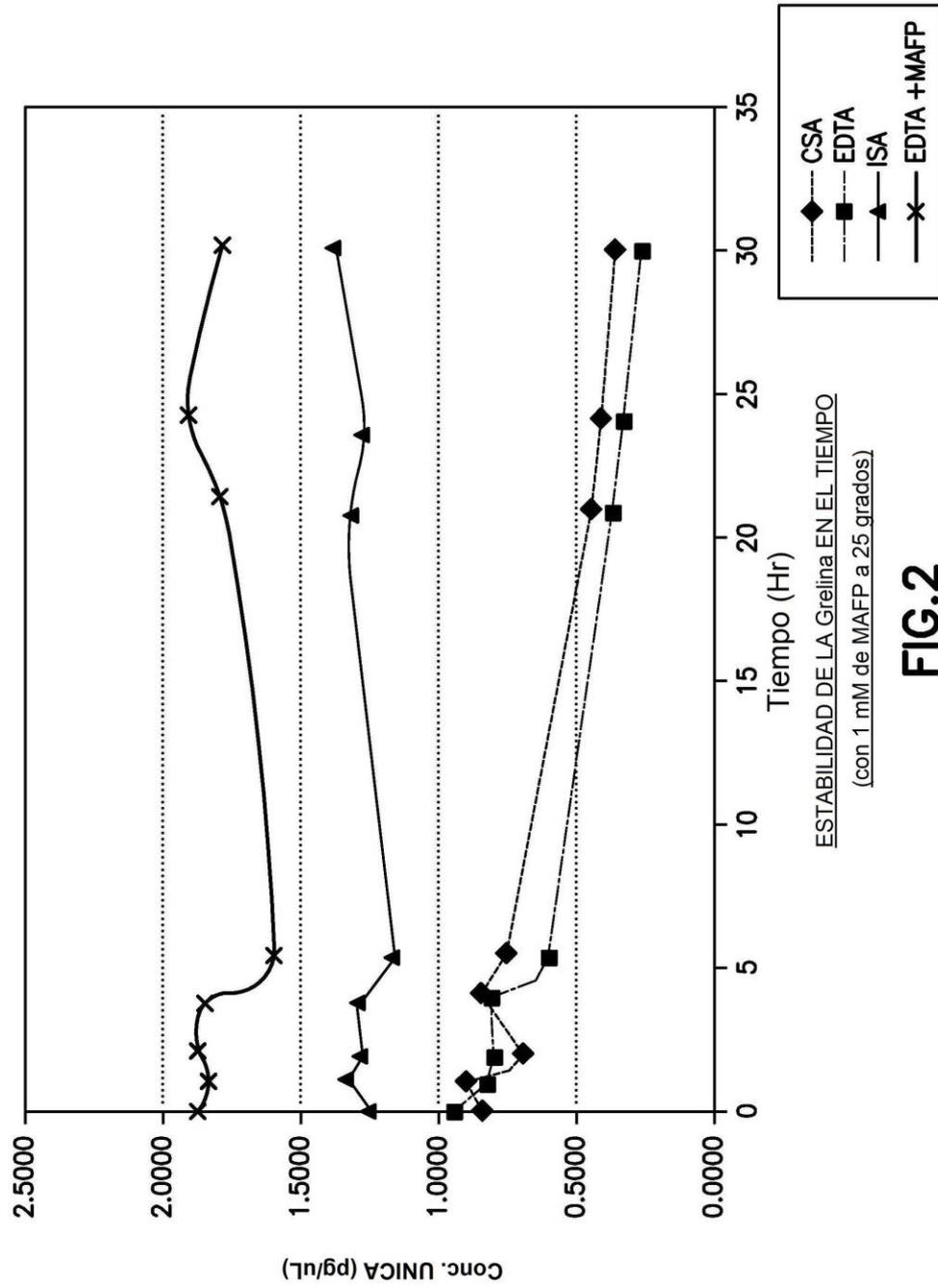
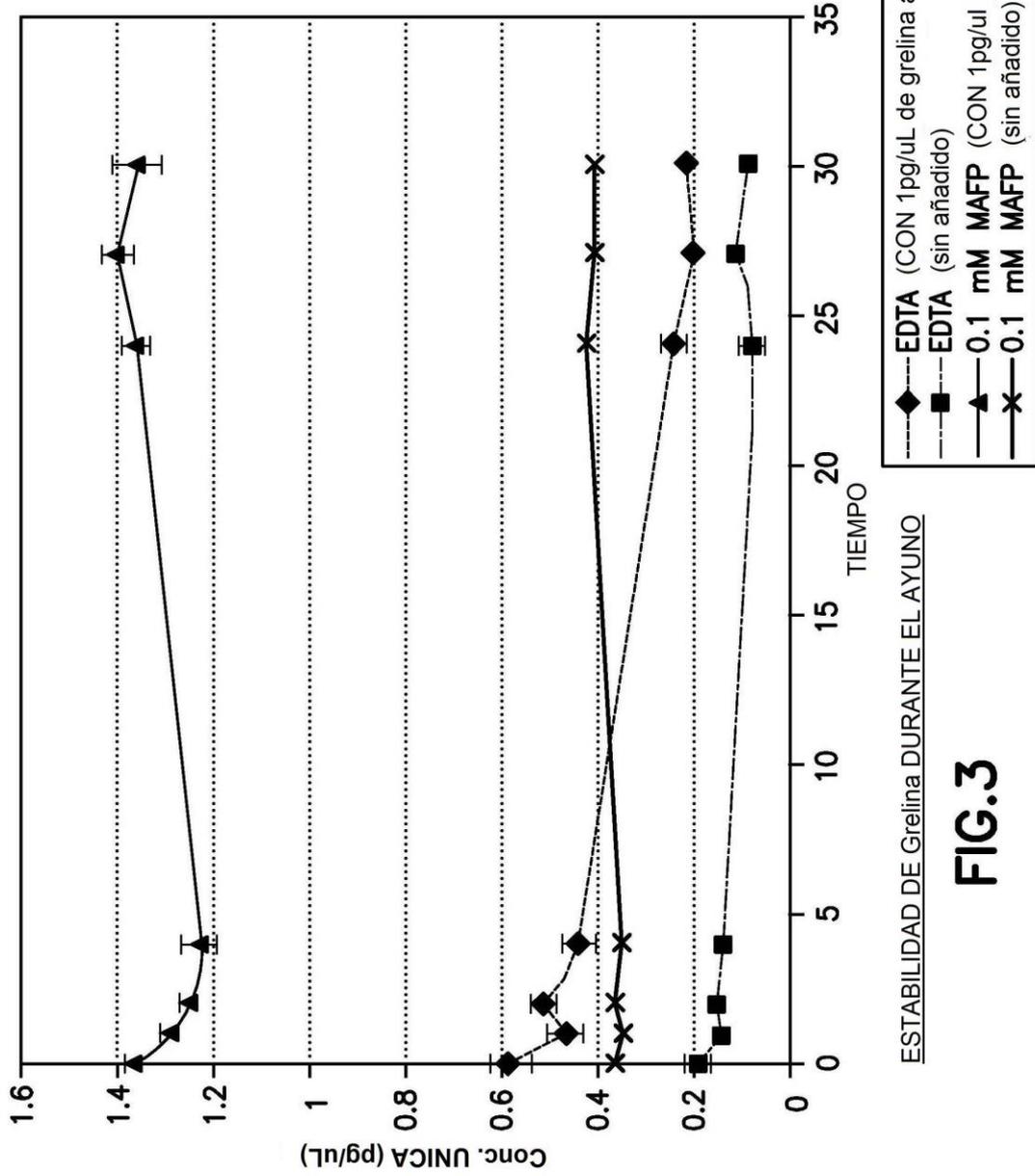


FIG.2



ESTABILIDAD DE Ghrelin DURANTE EL AYUNO

FIG.3