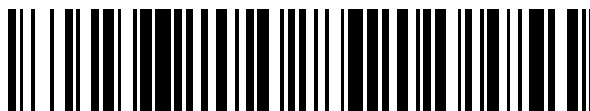


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 092**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

**C12Q 1/26** (2006.01)

**C12Q 1/54** (2006.01)

**G01N 33/66** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2013 PCT/EP2013/065983**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2013 E 13747811 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2883056**

54 Título: **Composición y uso de sustancias para la estabilización in vitro de glucosa, lactato y homocisteína en sangre**

30 Prioridad:

**09.08.2012 EP 12179907**

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

**23.02.2018**

73 Titular/es:

**WESER-BISSÉ, PETRA (100.0%)  
Alemannenstrasse 19  
79211 Denzlingen, DE**

72 Inventor/es:

**BISSÉ, EMMANUEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones :

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

ES 2 656 092 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

Composición y uso de sustancias para la estabilización *in vitro* de glucosa, lactato y homocisteína en sangre

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la estabilización y almacenamiento *ex vivo* de sangre. En particular, la presente invención se refiere a una composición para la estabilización de glucosa, lactato y homocisteína en sangre tras la recogida, al uso de las composiciones proporcionadas y a un método para la estabilización de glucosa, lactato y homocisteína en sangre tras la recogida, así como opcionalmente a la determinación *in vitro* de glucosa, lactato y homocisteína en sangre, y a un dispositivo de recogida de sangre proporcionado para dicho uso y método.

**Antecedentes de la invención**

10 La toma de muestras de sangre y los análisis se llevan a cabo de manera rutinaria con diversos fines de diagnóstico. La detección y cuantificación de glucosa en sangre, por ejemplo, se usa en el diagnóstico y tratamiento de trastornos del metabolismo de carbohidratos, tales como diabetes mellitus. La determinación de lactato en sangre se puede usar, por ejemplo, para analizar la homeostasis ácido-base y para investigar la acidosis láctica, hipoxia o septicemia, y para evaluar la adaptación al ejercicio. Un nivel incrementado de homocisteína total (tHcy) plasmática, por ejemplo,  
15 es un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular y un marcador sensible de las deficiencias de vitamina B. Para ser indicadores y predictores de diagnóstico útiles, se deberían determinar los niveles de tales componentes en sangre con exactitud y precisión.

Debido a que el metabolismo en las células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) continúa *ex vivo*, es decir, tras la recogida de la sangre, los niveles sanguíneos de glucosa, lactato y homocisteína pueden cambiar significativamente durante el tiempo transcurrido entre la extracción y el análisis, lo que potencialmente conduce a resultados erróneos, especialmente cuando el tiempo transcurrido es variable y no se controla, y cuando varían las condiciones de almacenamiento, tales como la temperatura. Debido a la glicolisis continuada en las células sanguíneas, principalmente en los eritrocitos, la concentración de la glucosa sanguínea disminuye tras la recogida. Chan *et al.* en *Clinical Chemistry*, 38, 1992, págs. 411-413 informó que la concentración de glucosa plasmática en  
20 muestras sanguíneas heparinizadas a temperatura ambiente disminuye a una velocidad de aproximadamente 0,3 mmol/L por hora durante las primeras 12 horas tras la recogida de la sangre. La disminución de la glucosa sanguínea va acompañada de un incremento de la concentración de lactato. Astles *et al.* en *Clinical Chemistry*, 40, 1994, págs. 1327-1330 indicó que el incremento de lactato era 0,7 mmol/L por hora, lo cual es grande a la vista del intervalo de referencia citado de 0,5-2,2 mmol/L para lactato. Debido al metabolismo continuado de homocisteína, en el que se forma homocisteína a partir de metionina por medio de reacciones de transferencia de metilo dependientes de adenosilmetionina, y la liberación continuada de homocisteína desde los eritrocitos, tHcy se incrementa tras la recogida de la sangre. Nauck *et al.* en *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 39, 2001, págs. 675-680 informó que a temperatura ambiente la concentración de tHcy se incrementa aproximadamente 1-2  $\mu\text{mol/L}$  por hora durante las primeras horas, lo que corresponde a un incremento de aproximadamente un 10% de tHcy por hora. Esto  
35 significa en general que, tras la recogida de la sangre, se consume continuamente glucosa en las células sanguíneas y se libera lactato y homocisteína de las células sanguíneas.

El cambio de los niveles de glucosa, lactato y homocisteína en sangre tras la recogida dependen del tiempo y la temperatura. Los cambios de la concentración plasmática de estas sustancias se pueden prevenir mediante la centrifugación inmediata y la extracción de las células sanguíneas. Esto requiere la adición de un anticoagulante, tal como una sal de EDTA, sal de citrato, sal de oxalato y sal de heparina, a la sangre completa. Además, es necesario que haya una centrífuga y la capacidad de procesamiento inmediato en o cerca del sitio de recogida de sangre, lo que puede ser problemático y poco práctico. Las muestras de sangre se pueden enfriar con hielo hasta la centrifugación para reducir los cambios en los niveles de glucosa, lactato y homocisteína. Sin embargo, la refrigeración con hielo puede no ser suficiente, y puede ser imposible o poco práctica, por ejemplo cuando existe un retraso sustancial entre la recogida y el procesamiento y el análisis, o cuando hay que recoger y transportar muchas muestras. Para el suero sanguíneo, los cambios en los niveles de glucosa, lactato y homocisteína se pueden dar porque se prepara el suero de una muestra de sangre dejada a temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para permitir la coagulación (aprox. 20-60 min), y la centrifugación y separación de las células sanguíneas solamente es posible posteriormente. El procesamiento preanalítico de la muestra puede interferir en el análisis posterior de glucosa, lactato y homocisteína o los co-análisis. Por ejemplo, la alteración de la integridad celular, tal como la hemólisis, puede ser problemática. Además, las etapas de procesamiento que consumen mucho tiempo o propensas a errores, por ejemplo la desproteinización mediante el uso de ácido tricloroacético, pueden no ser adecuadas en el procesamiento clínico rutinario.

40 Cuando una muestra de sangre no se puede separar o enfriar inmediatamente tras la recogida, además de un anticoagulante se puede añadir un agente antiglicolítico tal como yodoacetato, manosa o fluoruro como estabilizante. Sin embargo, la manosa puede interferir con los métodos de análisis enzimáticos que usan glucosa oxidasa o hexoquinasa. El fluoruro estabiliza la glucosa principalmente inhibiendo la enolasa de la ruta glicolítica. Chan *et al.* en *Clinical Chemistry*, 35, 1989, págs. 315-317 mostró que el fluoruro no impide la pérdida de glucosa plasmática completamente, y que a temperatura ambiente la concentración de glucosa en la sangre que contiene fluoruro

disminuye significativamente durante las primeras cuatro horas tras la recogida. Westgard *et al.* en *Clinical Chemistry*, 18, 1972, págs. 1334-1338 describió que la sangre completa estabilizada con fluoruro sódico y separada en 15 min proporciona una muestra aceptable para la determinación de lactato. Sin embargo, para el caso sin separación, Astles *et al.* informó que para las muestras de sangre con fluoruro sódico y oxalato potásico a temperatura ambiente, el lactato se incrementó en 0,2 mmol/L después de 1 hora tras la recogida. Se usa fluoruro, análogos de adenosina tales como 3-desazaadenosina o citrato para estabilizar tHcy tras la recogida de la sangre, pero el uso de estabilizantes conduce normalmente a desviaciones del valor inicial, y el problema de la estabilización de tHcy solamente se resuelve parcialmente. Ciertos estabilizantes de tHcy usados en general pueden afectar a técnicas analíticas tales como el inmunoensayo de polarización de fluorescencia, inmunoensayo de quimioluminiscencia e inmunoensayo ligado a enzimas (véase, p.ej., Nauck *et al.*).

Se ha considerado el uso de dos agentes para la inhibición de la glicolisis en muestras de sangre. Chan *et al.* (1992) informó del uso de fluoruro sódico y manosa, pero la estabilización de la concentración de la glucosa en sangre fue incompleta. Además, la manosa puede interferir con los métodos de análisis enzimáticos que usan glucosa oxidasa o hexoquinasa. Bueding y Goldfarb en *Journal of Biological Chemistry*, 141, 1941, págs. 539-544 demostraron el uso de yodoacetato sódico y fluoruro sódico para conservar glucosa y lactato. El uso de gliceraldehído y fluoruro sódico para la conservación de las concentraciones de glucosa plasmática se informó en le Roux *et al.* en *Annals of Clinical Biochemistry*, 41, 2004, págs. 43-46. La estabilización de la glucosa mediante el uso de fluoruro sódico y la acidificación con ácido cítrico se describió en Gambino *et al.* en *Clinical Chemistry*, 55, 2009, págs. 1019-1021. Sin embargo, aunque estos estudios se dirigieron a estabilizar glucosa y/o lactato, no se ha abordado la estabilización *in vitro* de glucosa, lactato y homocisteína en sangre.

McLean describió el catabolismo de carbohidratos en la glándula mamaria (*Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 30 (1958), págs. 303-315) estimando la actividad de hexoquinasa mediante el uso de 2-desoxiglucosa como sustrato, en la que la mezcla de reacción usada contuvo, entre otros, EDTA y fluoruro sódico.

Bishop intentó dilucidar la causa de la ruptura de los nucleótidos sanguíneos en el almacenamiento (*Transfusion Vol. 1* (1961), págs. 355-359). En ese documento, se observó que fluoruro, yodoacetato, arseniato o 2-desoxiglucosa provocaron una descomposición de nucleótidos de energía elevada similar a la observada en la hemolisis.

La patente de EE.UU. 4.054.488 trata sobre la conservación de glucosa (y ácido láctico) en las muestras de sangre, mediante el uso de sales de ácido yodoacético, sales de ácido bromoacético y sales de ácido mono-cloroacético.

Además, Horton *et al.* investigaron los efectos enzimáticos y metabólicos cerebrales de 2-desoxiglucosa (*Journal of Neurochemistry*, Vol. 21, Nº 3, 1973, págs. 507-520).

Existe la necesidad en la técnica de hacer una fase preanalítica más robusta y simple para el análisis exacto de la glucosa, lactato y homocisteína en sangre, a la vez que se evita un procesamiento en el lugar de extracción incómodo, complicado, propenso a errores, costoso, poco práctico o dependiente del tiempo, tal como una centrifugación o refrigeración inmediata de las muestras de sangre, y para proporcionar beneficios con respecto a una manipulación, almacenamiento y transporte mejorados de dichas muestras, así como al procesamiento de las muestras. En particular, el objetivo de la presente invención es efectuar una inhibición suficiente y predecible de la glicolisis y estabilizar de manera eficaz la glucosa, el lactato y la homocisteína en la sangre tras la recogida a temperatura ambiente, lo que permite un almacenamiento prolongado de la sangre y permite que la glucosa, el lactato y la homocisteína sanguíneas y otras sustancias se determinen con exactitud y de manera fiable mediante el uso de una única muestra.

### Sumario de la invención

El objetivo se resuelve mediante los métodos *in vitro* según las reivindicaciones 1 y 7, el uso según las reivindicaciones 8 y 12, el dispositivo de recogida de sangre según la reivindicación 9, el kit según la reivindicación 10 y la composición según la reivindicación 11, aunque se proporcionan las realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes y se describen adicionalmente más adelante.

La presente invención proporciona en particular los puntos siguientes, que incluyen aspectos principales y realizaciones preferidas, que en particular contribuyen respectivamente solos y en combinación a la resolución del objetivo anterior y finalmente proporcionan ventajas adicionales:

(1) Un método para el tratamiento de una muestra de sangre *in vitro*, en el que la sangre se mezcla *in vitro* con una composición que comprende

i) al menos un inhibidor de hexoquinasa, seleccionado del grupo que consiste en 2-desoxi-D-glucosa, 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa, 2-amino-2-desoxi-D-glucosa y ácido 3-bromopirúvico o una sal del mismo, con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre;

ii) al menos un agente inhibidor de la glicolisis que tiene actividad hacia otra enzima implicada en el catabolismo de la glucosa, que tiene actividad antiglicolítica hacia cualquiera de las enzimas de la ruta glicolítica posteriores a la hexoquinasa, y seleccionado del grupo que consiste en sal de fluoruro, ácido

yodoacético o una sal del mismo, ácido oxámico o una sal del mismo y ácido dicloroacético o una sal del mismo, con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre; y

5 opcionalmente iii) un anticoagulante y/o un estabilizante del plasma seleccionado del grupo que consiste en sal de EDTA, sal de citrato, sal de oxalato y sal de heparina, con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre, y

en el que dicha muestra de sangre se conserva para el análisis posterior.

(2) El método según el punto (1), en el que se estabiliza(n) uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína en la muestra de sangre, preferiblemente se estabiliza glucosa.

(3) El método según el punto (1) o (2), en el que la composición comprende además

10 iv) sal de amonio NR<sub>4</sub>X,

en el que cada R es independientemente hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal, alquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> ramificado, fenilo sin sustituir o fenilo sustituido, y X es haluro, hidróxido, alcóxido C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y acetato, y en el que preferiblemente cada R es independientemente hidrógeno, metilo o etilo, y X es fluoruro o cloruro, y en el que más preferiblemente NR<sub>4</sub>X es fluoruro de tetrametilamonio, cloruro de tetrametilamonio, cloruro de tetraetilamonio o NH<sub>4</sub>Cl.

15 (4) El método según el punto (3), en el que la concentración de la sal de amonio NR<sub>4</sub>X es 0,01 a 100 µmol/mL de sangre, preferiblemente es 0,1 a 10 µmol/mL de sangre, y más preferiblemente es 0,5 a 1 µmol/mL de sangre.

20 (5) El método según cualquiera de los puntos precedentes, en el que la concentración en masa del al menos un inhibidor de hexoquinasa i) preferiblemente es al menos 0,02 mg/mL de sangre, aún más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 25 mg/mL de sangre, y lo más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 4 mg/mL de sangre,

en el que la concentración en masa del al menos un agente inhibidor de la glicolisis ii) preferiblemente es al menos 0,02 mg/mL de sangre, aún más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 25 mg/mL de sangre y lo más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 4 mg/mL de sangre,

25 en el que opcionalmente la concentración en masa del anticoagulante opcional iii) preferiblemente es al menos 0,1 mg/mL de sangre, aún más preferiblemente está en un intervalo de 0,1 a 25 mg/mL de sangre y lo más preferiblemente está en un intervalo de 1 a 2,5 mg/mL de sangre o 12 a 30 IU/mL de sangre,

30 y en el que preferiblemente la proporción de las concentraciones en masa del al menos un inhibidor de hexoquinasa i) y el al menos un agente inhibidor de la glicolisis ii) está en un intervalo de 100:1 a 1:100, más preferiblemente está en un intervalo de 50:1 a 1:50, aún más preferiblemente está en un intervalo de 25:1 a 1:25 y lo más preferiblemente está en un intervalo de 10:1 a 1:10.

(6) El método según cualquiera de los puntos precedentes, en el que la composición está en forma sólida, forma liofilizada o en solución, y en el que en un caso se prefiere una solución acuosa o solución acuosa ácida diluida.

(7) El método según cualquiera de los puntos precedentes, en el que la composición está exenta sustancialmente de agentes para la lisis de células sanguíneas.

35 (8) El método según cualquiera de los puntos precedentes, que contiene además un tampón y/o un aditivo usado habitualmente para conservar la sangre, preferiblemente en un contenido de hasta un 50 % en peso.

(9) Un método para la inhibición de la glicolisis y opcionalmente la coagulación en una muestra de sangre *in vitro*, en el que la sangre se mezcla tras su extracción con la composición tal como se expuso en cualquiera de los puntos (1) a (8).

40 (10) Un método de diagnóstico *in vitro*, en el que la(s) cantidad(es) de componente(s) sanguíneo(s) se determina(n) en una muestra de sangre estabilizada mezclada con la composición tal como se expuso en cualquiera de los puntos (1) a (8), en el que se estabiliza(n) uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína, y la determinación de la(s) cantidad(es) de el/los componente(s) sanguíneo(s) respectivo(s) se lleva a cabo mediante el uso de métodos físicos, químicos, enzimáticos y/o inmunológicos convencionales, lo que incluye las combinaciones de los mismos.

45 (11) El método según los puntos (9) o (10), en el que se estabilizan uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína.

(12) El método según cualquiera de los puntos (9) a (11), en el que se estabilizan uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína a temperatura ambiente durante hasta 50 horas tras la recogida de la sangre.

(13) El método según cualquiera de los puntos (9) a (12), en el que se estabilizan simultáneamente glucosa, lactato y homocisteína.

50 (14) El método según cualquiera de los puntos precedentes, en el que se determina la cantidad de uno y/o más de

## ES 2 656 092 T3

glucosa, lactato y homocisteína en sangre y/u otro(s) componente(s) sanguíneo(s), que comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar un dispositivo de recogida de sangre que comprende, colocado en el dispositivo, la composición tal como se expuso en cualquiera de los puntos (1) a (14);
- 5 (b) colocar sangre en el dispositivo de recogida de sangre;
- (c) mezclar la composición tal como se expuso en cualquiera de los puntos (1) a (14) con la sangre en el dispositivo de recogida de sangre;
- 10 opcionalmente (d) almacenar la sangre en el dispositivo de recogida de sangre durante un periodo predeterminado de tiempo durante el cual los niveles de glucosa, lactato y homocisteína son sustancialmente constantes; y
- (e) determinar la cantidad de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína y/u otro(s) componente(s) sanguíneo(s) en la muestra de sangre.
- (15) El método según el punto (14), en el que, en vez de las etapas (a) y (b), se lleva a cabo una etapa que comprende colocar sangre en un dispositivo de recogida de sangre y posteriormente colocar una composición de la presente invención en el dispositivo de recogida de sangre.
- 15 (16) El método según cualquiera de los puntos (14) o (15), en el que se lleva a cabo la etapa (d) a temperatura ambiente durante hasta 50 horas.
- (17) El método según cualquiera de los puntos (14) a (16), en el que la sangre de la etapa (b) es sangre completa.
- (18) El método según cualquiera de los puntos (14) a (17), en el que la glucosa, lactato y homocisteína de la etapa (e) son glucosa plasmática, lactato plasmático y homocisteína plasmática, respectivamente.
- 20 métodos físicos, químicos, enzimáticos y/o inmunológicos convencionales, lo que incluye las combinaciones de los mismos.
- (20) El método según cualquiera de los puntos precedentes, en el que se inhibe sustancialmente la lisis de las células sanguíneas, y preferiblemente se inhibe la lisis de las células sanguíneas.
- 25 (21) El uso de la composición tal como se expuso en cualquiera de los puntos (1) a (8) para la inhibición de la glicolisis y opcionalmente la coagulación en una muestra de sangre *in vitro*.
- (22) El uso según el punto (22), en el que se estabiliza cualquiera de glucosa, lactato y homocisteína en la sangre.
- (23) El uso según el punto (22), en el que se estabiliza cualquier combinación de glucosa, lactato y homocisteína.
- (24) El uso según el punto (22), en el que se estabilizan simultáneamente glucosa, lactato y homocisteína.
- 30 (25) El uso según cualquiera de los puntos (22) a (24), en el que se estabilizan glucosa, lactato y/u homocisteína a temperatura ambiente durante hasta 50 horas tras la recogida de la sangre.
- (26) El uso según cualquiera de los puntos (21) a (25), en el que, de manera concurrente o posteriormente al uso de una composición como se expuso en cualquiera de los puntos (1) a (8), (a) el/los análisis se lleva(n) a cabo para la determinación de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína, y opcionalmente un componente sanguíneo adicional.
- 35 (27) Un dispositivo de recogida de sangre que comprende la composición como se expuso en cualquiera de los puntos (1) a (8).
- (28) El dispositivo de recogida de sangre según el punto (27), que comprende un dispositivo que es capaz de conectarse a un dispositivo de extracción de sangre convencional.
- 40 (29) El uso del dispositivo de recogida de sangre según los puntos (27) o (28) para la estabilización y/o el almacenamiento de una muestra de sangre *in vitro*.
- (30) El uso según el punto (29), en el que la muestra de sangre se estabiliza y/o se almacena a temperatura ambiente durante hasta 50 horas tras la recogida de la sangre.
- 45 (31) El uso según los puntos (29) o (30), en el que, de manera concurrente o posteriormente al uso de una composición como se expuso en cualquiera de los puntos (1) a (8), (a) el/los análisis se lleva(n) a cabo para la determinación de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína, y opcionalmente un componente sanguíneo adicional.

(32) Un kit que comprende:

el dispositivo de recogida de sangre según el punto (27) o (28), y

sustancias de ensayo para la determinación de al menos uno, opcionalmente todos simultáneamente, de glucosa, lactato y homocisteína, y opcionalmente un componente sanguíneo adicional en la sangre recogida.

(33) Una composición como se expuso en cualquiera de las reivindicaciones (1) a (8) para la estabilización de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína en sangre.

(34) La composición según el punto (33), en la que el al menos un agente inhibidor de la glicolisis ii) es  $\text{NH}_4\text{F}$ .

(35) El uso de al menos un agente inhibidor de la glicolisis para la estabilización y determinación *ex vivo* de homocisteína en sangre tras la extracción, en el que el al menos un agente inhibidor de la glicolisis preferiblemente tiene actividad hacia una enzima implicada en el catabolismo de la glucosa, y se selecciona del grupo que consiste en sal de fluoruro, ácido yodoacético o una sal del mismo, ácido oxámico o una sal del mismo y ácido dicloroacético o una sal del mismo, con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre.

(36) El uso según el punto (35), en el que el al menos un agente inhibidor de la glicolisis tiene actividad hacia una enzima implicada en el catabolismo de la glucosa.

(37) El uso según el punto (35), en el que el al menos un agente inhibidor de la glicolisis tiene actividad antiglicolítica hacia cualquiera de las enzimas de la ruta glicolítica.

(38) El uso según el punto (37), en el que el al menos un agente inhibidor de la glicolisis es al menos un inhibidor de hexoquinasa.

#### Descripción detallada de la invención

A continuación, la presente invención se describe con más detalle mientras se hace referencia a las realizaciones y los ejemplos preferidos, que se presentan, sin embargo, con fines ilustrativos y no se debería considerar que limiten la invención de ninguna manera.

Un primer aspecto de la presente invención es un método para el tratamiento de una muestra de sangre *in vitro*, en el que la sangre se mezcla *in vitro* con una composición que comprende al menos un inhibidor de hexoquinasa, al menos un agente inhibidor de la glicolisis que tiene actividad hacia otra enzima implicada en el catabolismo de la glucosa, y opcionalmente un anticoagulante y/o un estabilizante del plasma, y en el que dicha muestra de sangre se conserva de manera eficaz para el análisis posterior.

Según la invención, se inhibe de manera eficaz la glicolisis y opcionalmente la coagulación en una muestra de sangre *in vitro* cuando se mezcla la sangre tras su extracción con la composición según la presente invención. En particular, así se estabiliza uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína en la muestra de sangre.

La composición según la invención se proporciona para la estabilización de uno y/o más, preferiblemente todos, de glucosa, lactato y homocisteína en sangre, en la que la composición comprende al menos un inhibidor de hexoquinasa, al menos un agente inhibidor de la glicolisis que tiene actividad hacia otra enzima implicada en el catabolismo de la glucosa, y opcionalmente un anticoagulante y/o un estabilizante del plasma. Así, se puede conseguir la estabilización en sangre *in vitro*.

La hexoquinasa cataliza la primera etapa de la glicolisis, es decir, la ruta metabólica que convierte glucosa en piruvato, y dicha primera etapa es la fosforilación de la glucosa. La glucosa y glucosa 6-fosfato se pueden catabolizar, es decir, descomponer, para proporcionar energía, pero también para servir como fuente de carbono, y también están implicadas en varias rutas metabólicas distintas de la glicolisis. Sorprendentemente, en la presente invención se descubrió que una composición que comprende una combinación de al menos un inhibidor de hexoquinasa y al menos un agente que tiene actividad hacia otra enzima implicada en el catabolismo de la glucosa con un efecto inhibitorio sobre la glicolisis estabiliza uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína en sangre tras la recogida, en particular de manera eficaz, rápida y continuamente.

Esto es inesperado, considerando en particular que se ha demostrado que las sustancias conocidas y usadas en la técnica, tales como fluoruro, yodoacetato o manosa, son insuficientes al dar como resultado una disminución de la concentración de la glucosa sanguínea con el tiempo. Incluso las composiciones con dos agentes para la inhibición de la glicolisis conocidas en la técnica, aunque tienen potencialmente una acción antiglicolítica mejorada en comparación con los casos en los que se usa solamente un agente antiglicolítico, por una parte pueden no ser todavía eficaces en los primeros intervalos de tiempo tras la recogida de la sangre (yodoacetato y fluoruro), o por otra parte pueden ser inespecíficos y así no bien controlados o predecibles en su inhibición (gliceraldehído y fluoruro; fluoruro y acidificación). Además, antes de la combinación particular de la presente invención, la estabilización eficaz no solamente se ha visto afectada por una inhibición insuficiente de la glicolisis, sino por factores tales como la pérdida de la integridad celular, el cambio de la osmolaridad y el escape de iones, así como por la interferencia en el

análisis de analitos posterior que también hay que tener en cuenta. Por ejemplo, una acidificación excesiva y el uso de gliceraldehído pueden interferir en la determinación de lactato.

5 Según una realización especialmente ventajosa, la sangre se mezcla *in vitro* con una composición que comprende no solamente el al menos un inhibidor de hexoquinasa, el al menos un agente inhibidor de la glicolisis que tiene actividad hacia otra enzima implicada en el catabolismo de la glucosa y opcionalmente el anticoagulante y/o el estabilizante del plasma, sino además una sal de amonio NR<sub>4</sub>X, en la que cada R es independientemente hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal, alquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> ramificado, fenilo sin sustituir o fenilo sustituido, y X es haluro, hidróxido, alcóxido C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y acetato. Preferiblemente, cada R es independientemente hidrógeno, metilo o etilo, y X es fluoruro o cloruro. Más preferiblemente, NR<sub>4</sub>X es fluoruro de tetrametilamonio, cloruro de tetrametilamonio, cloruro de tetraetilamonio o NH<sub>4</sub>Cl. La concentración de la sal de amonio NR<sub>4</sub>X no está limitada especialmente. En particular, el límite superior no está limitado especialmente. Un límite inferior preferido es 0,01 μmol/mL de sangre. En una realización preferida, la concentración de la sal de amonio NR<sub>4</sub>X es 0,01 a 100 μmol/mL de sangre, más preferiblemente es 0,1 a 10 μmol/mL de sangre, y aún más preferiblemente es 0,5 a 1 μmol/mL de sangre.

15 Según la presente invención, preferiblemente se evita sustancialmente la lisis de las células sanguíneas, y más preferiblemente se evita la lisis de las células sanguíneas. Preferiblemente, se inhibe sustancialmente la lisis de las células sanguíneas, y más preferiblemente se inhibe la lisis de las células sanguíneas. La composición de la invención, por lo tanto, preferiblemente está exenta sustancialmente de agentes para la lisis de las células sanguíneas, y más preferiblemente está exenta de agentes para la lisis de las células sanguíneas.

20 Sorprendentemente, se descubrió que cuando la sal de amonio iv) de la invención se incluye adicionalmente en la composición, se puede inhibir de manera eficaz y efectiva la hemolisis (véanse también los Ejemplos 10-13 y la Tabla 10). Este efecto ventajoso es especialmente relevante en los casos en los que la existencia de hemolisis se debe reducir significativamente o incluso evitar de manera segura y adecuada, o cuando la presencia de agentes que pueden afectar a la estabilidad celular no se puede descartar o evitar completamente. La hemolisis puede desestabilizar adicionalmente de manera significativa la muestra, e impedir el almacenamiento prolongado. Además, la hemolisis puede ser perjudicial para los análisis de sangre y el diagnóstico ya que, por ejemplo, la mezcla de los componentes plasmáticos con los componentes celulares de las células lisadas puede conducir a resultados falsos para los análisis tanto del plasma como de las células, o incluso impedir completamente tales análisis. Por lo tanto, la inhibición de la hemolisis es ventajosa para la determinación fiable de los componentes sanguíneos.

25 Por lo tanto, la aportación de la sal de amonio iv) como aditivo adicional proporciona beneficios adicionales significativos. En particular, se estabiliza(n) uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína, preferiblemente todos, en la muestra de sangre, mientras además se puede incrementar significativamente la inhibición de la hemolisis. Esta estabilización y conservación mejorada adicional de una muestra de sangre puede proporcionar un almacenamiento más largo y una determinación más fiable de los componentes de la sangre, y así diagnósticos mejorados.

30 El al menos un inhibidor de hexoquinasa se selecciona del grupo que consiste en 2-desoxi-D-glucosa, 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa, 2-amino-2-desoxi-D-glucosa y ácido 3-bromopirúvico o una sal del mismo, con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre. 2-Desoxi-D-glucosa, 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa y 2-amino-2-desoxi-D-glucosa son análogos de glucosa e inhibidores de la hexoquinasa, que se pueden fosforilar pero no metabolizar. El ácido 3-bromopirúvico es un agente alquilante fuerte que inhibe la hexoquinasa.

35 El al menos un agente inhibidor de la glicolisis tiene actividad antiglicolítica hacia cualquiera de las enzimas de la ruta glicolítica posterior a hexoquinasa, que comprende fosfoglucosa isomerasa, fosfofructoquinasa, aldolasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa y piruvato quinasa. El al menos un agente inhibidor de la glicolisis se selecciona del grupo que consiste en sal de fluoruro, ácido yodoacético o una sal del mismo, ácido oxámico o una sal del mismo y ácido dicloroacético o una sal del mismo con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre. El fluoruro tiene un efecto inhibitorio sobre la enolasa, el yodoacetato inhibe la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, mientras el oxamato inhibe la lactato deshidrogenasa que cataliza la conversión de piruvato en lactato. El dicloroacetato estimula la actividad de la piruvato deshidrogenasa inhibiendo la piruvato deshidrogenasa quinasa, lo que disminuye la formación de lactato.

40 El inhibidor de hexoquinasa es preferiblemente un inhibidor reversible o irreversible de hexoquinasa, en el que la hexoquinasa comprende las isoformas o isozimas de dicha enzima, lo que incluye la glucoquinasa. En el caso de la inhibición reversible, la inhibición puede ser competitiva, acompetitiva, mixta y no competitiva.

45 Preferiblemente, el inhibidor de hexoquinasa es específico, es decir, la inhibición es diferente de la inactivación enzimática irreversible mediante efecto(s) inespecífico(s) tal(es) como en general la destrucción de la estructura de la proteína o la desnaturalización, por ejemplo provocada mediante cambios de pH o temperatura. El efecto inhibitorio de un inhibidor de hexoquinasa se puede ensayar proporcionando dicho inhibidor, una hexosa, preferiblemente glucosa, como sustrato, ATP y hexoquinasa *in vitro*, preferiblemente en condiciones fisiológicas o casi fisiológicas, y medir la concentración dependiente del tiempo de la hexosa y la hexosa fosforilada, en la que hay un efecto inhibitorio cuando la concentración de hexosa disminuye con el tiempo más lentamente o no disminuye en absoluto, y/o la concentración de hexosa fosforilada se incrementa con el tiempo más lentamente o no se incrementa

en absoluto en comparación con un sistema que carece del inhibidor.

El agente inhibidor de la glicolisis que tiene actividad hacia otra enzima implicada en el catabolismo de la glucosa es preferiblemente un inhibidor enzimático y/o activador enzimático específico hacia cualquiera de las enzimas implicadas en el catabolismo de la glucosa, en la que dicho agente inhibe la glicolisis. En el caso de un inhibidor enzimático, la inhibición puede ser irreversible o reversible, y la inhibición reversible puede ser competitiva, acompetitiva, mixta y no competitiva. Preferiblemente, el inhibidor enzimático es específico, es decir, la inhibición es diferente de la inactivación enzimática irreversible mediante efecto(s) inespecífico(s) tal(es) como en general la destrucción de la estructura de la proteína o la desnaturalización, por ejemplo provocada mediante cambios de pH o temperatura. En el caso de un activador enzimático, dicho activador es preferiblemente un agente que interacciona de manera específica con una enzima e incrementa la actividad de esta última, por ejemplo por medio de un efecto alostérico. El efecto inhibitorio del agente inhibidor de la glicolisis sobre la glicolisis se puede ensayar monitorizando a lo largo del tiempo las concentraciones de glucosa y/o piruvato o de lactato, respectivamente.

El anticoagulante opcional preferiblemente está presente, y en general es adicional a/distinto del al menos un inhibidor de hexoquinasa y del al menos un agente inhibidor de la glicolisis, más preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en una sal de EDTA, sal de citrato, sal de oxalato y sal de heparina con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre. En una realización, se prefiere más el heparinato de litio o heparinato de amonio y la sal de EDTA, y en particular los más preferidos son el heparinato de litio o heparinato de amonio, porque es susceptible a la determinación de una multitud de co-analitos, mientras, por ejemplo, la sal de EDTA puede limitar el número de analitos determinables. De manera inesperada, se descubrió en la presente invención que cuando la composición de la invención comprende heparinato, la glucosa, el lactato y la homocisteína se estabilizan especialmente rápido, de manera eficaz y continuamente.

En el caso que uno y/o más del al menos un inhibidor de hexoquinasa, el al menos un agente inhibidor de la glicolisis que tiene actividad hacia otra enzima implicada en el catabolismo de la glucosa y opcionalmente el anticoagulante y/o el estabilizante del plasma se proporcione(n) en forma de sal, en particular las sales tal como se expuso en los puntos (1) a (4), la hemolisis se puede inhibir significativamente de manera inesperada y ventajosa proporcionando al menos una sal de dichos agentes en forma de una sal de amonio (véanse también los Ejemplos 8 y 9, y la Tabla 10). La sal de amonio significa una sal de  $\text{NR}_4^+$ , en la que cada R es independientemente hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  lineal, alquilo  $\text{C}_3\text{-C}_6$  ramificado, fenilo sin sustituir o fenilo sustituido, y en la que preferiblemente cada R es independientemente hidrógeno, metilo o etilo, y en la que más preferiblemente  $\text{NR}_4^+$  es ión de tetrametilamonio, ión de tetraetilamonio o  $\text{NH}_4^+$ , y en la que lo más preferiblemente  $\text{NR}_4^+$  es  $\text{NH}_4^+$ . Se prefiere en particular que todas las sales expuestas en los puntos (1) a (4) sean sales de  $\text{NR}_4^+$ , tal como se especificó.

Por lo tanto, la aportación de una sal de amonio a uno y/o más de los agentes tal como se expuso en los puntos (1) a (4) puede proporcionar beneficios adicionales significativos con respecto a la estabilización y conservación de una muestra de sangre, y puede facilitar la determinación fiable de los componentes sanguíneos.

Es especialmente ventajoso cuando la sal de amonio para uno y/o más de los agentes como se expuso en los puntos (1) a (4), y además la sal de amonio iv) como aditivo adicional se proporcionan juntas en la composición. De esta manera, por ejemplo, se pueden minimizar o evitar aún más los cambios de osmolaridad y la salida de agua de las células sanguíneas, que conduciría a un posible efecto de dilución y deterioro de la integridad celular debido a la deshidratación de las células sanguíneas. Esto puede conducir a una inhibición incrementada de la hemolisis y a una estabilización aún más mejorada de la muestra de sangre.

La composición según la presente invención puede comprender un tampón y/o un aditivo usado habitualmente en la fase preanalítica de sangre y para conservar la sangre, preferiblemente en un contenido de hasta un 50 % en peso. Preferiblemente, la composición es estable a temperatura ambiente y conserva su efecto durante varias semanas, más preferiblemente durante varios meses, y lo más preferiblemente durante varios años, por lo que se prolonga la duración del almacenamiento.

En una realización específica, se estabiliza uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína a temperatura ambiente durante hasta 50 horas tras la recogida de la sangre. Sin embargo, se incluye una temperatura de 0 °C a 37 °C y un tiempo tras la recogida de hasta 96 horas en el método según la presente invención. De manera inesperada y ventajosa, el método de la presente invención estabiliza simultáneamente glucosa, lactato y homocisteína. En una realización en la que se determina la cantidad de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína en sangre y/u otro(s) componente(s) sanguíneo(s), se incluyen las siguientes etapas.

Se proporciona un dispositivo de recogida de sangre que comprende, colocada en el dispositivo, una composición según la presente invención, seguido de colocar sangre en dicho dispositivo de recogida de sangre. De manera alternativa, la sangre se coloca en un dispositivo de recogida de sangre y posteriormente se coloca una composición de la presente invención en el dispositivo de recogida de sangre. La composición de la presente invención se mezcla con la sangre en el dispositivo de recogida de sangre. Opcionalmente, la sangre se almacena en el dispositivo de recogida de sangre durante un periodo predeterminado de tiempo, por ejemplo hasta el procesamiento, tal como centrifugación o análisis, y durante hasta 50, 72 o 96 horas a temperatura ambiente, durante lo cual los niveles de glucosa, lactato y homocisteína son sustancialmente constantes. En una etapa adicional, se determina la cantidad



de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína y/u otro(s) componente(s) sanguíneo(s) de la muestra de sangre, por ejemplo, mediante el uso de métodos físicos, químicos, enzimáticos y/o inmunológicos convencionales, lo que incluye las combinaciones de los mismos. Sin limitarse a ello, los métodos analíticos pueden comprender cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas (MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas con dilución isotópica (GC-ID-MS), cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía líquida de alta presión con detección de fluorescencia (HPLC-FD), HPLC con detección electroquímica (HPLC-ED), inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), inmunoensayo de quimioluminiscencia (p.ej. ICL), inmunoensayo ligado a enzimas (EIA), cromatografía de intercambio iónico (IEC), electroforesis capilar y electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser, en las que la HPLC y los inmunoensayos se usan especialmente de manera generalizada en los laboratorios clínicos.

Después de mezclar la composición de la presente invención y la sangre, la concentración en masa del al menos un inhibidor de hexoquinasa es al menos 0,01 mg/mL de sangre, preferiblemente es al menos 0,02 mg/mL de sangre, más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 25 mg/mL de sangre y lo más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 4 mg/mL de sangre, la concentración en masa del al menos un agente inhibidor de la glicolisis es al menos 0,01 mg/mL de sangre, preferiblemente es al menos 0,02 mg/mL de sangre, más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 25 mg/mL de sangre y lo más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 4 mg/mL de sangre, opcionalmente la concentración en masa del anticoagulante opcional es al menos 0,01 mg/mL de sangre, preferiblemente es al menos 0,1 mg/mL de sangre, más preferiblemente está en un intervalo de 0,1 a 25 mg/mL de sangre y lo más preferiblemente está en un intervalo de 1 a 2,5 mg/mL de sangre o 12 a 30 IU/mL de sangre, y preferiblemente la proporción de las concentraciones en masa del al menos un inhibidor de hexoquinasa y el al menos un agente inhibidor de la glicolisis está en un intervalo de 100:1 a 1:100, más preferiblemente está en un intervalo de 50:1 a 1:50, aún más preferiblemente está en un intervalo de 25:1 a 1:25 y lo más preferiblemente está en un intervalo de 10:1 a 1:10. Preferiblemente, la sangre completa se mezcla, y preferiblemente se determina la glucosa plasmática, el lactato plasmático y la homocisteína plasmática, respectivamente. El uso del análisis de sangre completa y plasma en vez de suero es ventajoso, ya que no es necesario esperar un tiempo para la coagulación, hay más material de muestra y no hay artefactos originados por los efectos de la coagulación, tal como hemolisis ligera o coagulación en curso tras la centrifugación. Los niveles sustancialmente constantes son preferiblemente niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 4 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 8 % para lactato, más preferiblemente son niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 3 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 5 % para lactato, aún más preferiblemente son niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 2 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 4 % para lactato, aún más preferiblemente son niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 1,5 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 3 % para lactato, y lo más preferiblemente son niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 1 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 2 % para lactato.

La composición según la presente invención se proporciona preferiblemente en forma sólida, forma liofilizada o en solución, y en la que en un caso se prefiere una solución acuosa o solución acuosa ácida diluida. En una realización, se usa una solución acuosa ácida diluida para aumentar la solubilidad de las sustancias de la composición de la invención, es decir, es un disolvente o un solubilizante. Sin embargo, en un caso de una solución, se prefiere más el agua, porque una acidificación excesiva puede interferir en la determinación de lactato. En una realización, la composición de la invención no contiene ácido como aditivo, más preferiblemente no contiene ácido.

En el método de inhibición de la glicolisis y opcionalmente la coagulación en una muestra de sangre *in vitro*, la sangre se mezcla tras su extracción con la composición según la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro*, en el que la(s) cantidad(es) de componente(s) sanguíneo(s) se determina(n) en una muestra de sangre estabilizada mezclada con la composición según la presente invención. En particular, se estabiliza uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína, preferiblemente a temperatura ambiente durante hasta 50 horas tras la recogida de la sangre. Preferiblemente se estabiliza simultáneamente la glucosa, el lactato y la homocisteína. La determinación de la(s) cantidad(es) de el/los componente(s) sanguíneo(s) respectivo(s) se lleva a cabo mediante el uso de métodos físicos, químicos, enzimáticos y/o inmunológicos convencionales, lo que incluye las combinaciones de los mismos.

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de la composición de la invención para la inhibición del sistema de enzimas glicolíticas y la glicolisis, y opcionalmente la coagulación, en una muestra de sangre *in vitro*. De manera inesperada, en la presente invención se descubrió que el uso de la composición de la presente invención estabiliza de manera eficaz cualquiera de glucosa, lactato y homocisteína, y cualquier combinación de los mismos, en la sangre. Aún más sorprendentemente, en la presente invención se descubrió que el uso de la composición de la presente invención estabiliza simultáneamente de manera eficaz y ventajosa la glucosa, el lactato y la homocisteína en la sangre tras la recogida. Esto permite determinar con exactitud y de manera fiable la glucosa, el lactato y la homocisteína de la sangre mediante el uso de una única muestra. Según este aspecto de la invención, preferiblemente y de manera ventajosa se puede almacenar y transportar a temperatura ambiente glucosa, lactato y/u homocisteína durante hasta 50 horas, más preferiblemente durante hasta 72 horas, lo más preferiblemente

durante 96 horas tras la recogida de la sangre.

Mediante el uso de los agentes antiglicolíticos según la presente invención y además un anticoagulante, se puede almacenar y transportar una muestra de sangre sustancialmente en un estado fisiológicamente nativo. La temperatura ambiente indica un intervalo de temperaturas de 20 °C a 25 °C. Sin embargo, también puede ser aceptable una temperatura por encima o por debajo de la temperatura ambiente, y un intervalo de temperatura de 0 °C a 37 °C se halla dentro del uso de la presente invención. Además y preferiblemente, de manera concurrente o posteriormente al uso de la composición según la presente invención, (a) se lleva(n) a cabo análisis para la determinación de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína, y opcionalmente un componente sanguíneo adicional. De manera ventajosa, se puede usar una única muestra para un análisis multi-analito, y preferiblemente se evita sustancialmente la posible interferencia de los componentes de la composición de la invención en el ensayo analítico de glucosa, lactato y homocisteína y otros co-analitos, y más preferiblemente se evita eligiendo componentes que cumplen o no interfieren en los análisis posteriores respectivamente. La composición según la presente invención se puede usar de manera ventajosa para incrementar la fiabilidad del diagnóstico y el pronóstico. En vista del riesgo potencial de hemolisis y la posible interferencia con los análisis por su causa, según una realización preferida, se añade además la sal de amonio iv) a la composición.

Otro aspecto de la presente invención es un dispositivo de recogida de sangre que comprende la composición de la presente invención, en el que el dispositivo de recogida de sangre comprende preferiblemente un dispositivo que es capaz de conectarse con un dispositivo de extracción de sangre convencional. Los tubos de recogida de sangre convencionales, que incluyen tubos de recogida de sangre a vacío tales como Vacutainer y sistemas de aspiración tales como Monovette, se conocen en la técnica.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del dispositivo de recogida de sangre según la presente invención para estabilizar y/o almacenar una muestra de sangre *in vitro*, en el que preferiblemente la muestra de sangre se estabiliza y/o se almacena a temperatura ambiente durante hasta 50 horas tras la recogida de la sangre. Sin embargo, se incluye un intervalo de temperatura de 0 °C a 37 °C y un tiempo de almacenamiento de hasta 96 horas en la invención. Este aspecto de la presente invención proporciona un uso especialmente eficaz, en el que de manera concurrente o posteriormente (a) el/los análisis se lleva(n) a cabo preferiblemente para la determinación de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína, y opcionalmente un componente sanguíneo adicional.

Se proporciona un dispositivo de recogida de sangre que comprende, colocada en el dispositivo, una composición según la presente invención, seguido de colocar sangre en dicho dispositivo de recogida de sangre. De manera alternativa, la sangre se coloca en un dispositivo de recogida de sangre y posteriormente se coloca una composición de la presente invención en el dispositivo de recogida de sangre. La composición de la presente invención se mezcla con la sangre en el dispositivo de recogida de sangre. Opcionalmente, la sangre se almacena en el dispositivo de recogida de sangre durante un periodo predeterminado de tiempo, por ejemplo hasta el procesamiento, tal como centrifugación o análisis, y durante hasta 50, 72 o 96 horas a temperatura ambiente, durante lo cual los niveles de glucosa, lactato y homocisteína son sustancialmente constantes. En una etapa adicional, se determina la cantidad de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína y/u otro(s) componente(s) sanguíneo(s) de la muestra de sangre, por ejemplo, mediante el uso de métodos físicos, químicos, enzimáticos y/o inmunológicos convencionales, lo que incluye las combinaciones de los mismos. Sin limitarse a ello, los métodos analíticos pueden comprender cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas (MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas con dilución isotópica (GC-ID-MS), cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía líquida de alta presión con detección de fluorescencia (HPLC-FD), HPLC con detección electroquímica (HPLC-ED), inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), inmunoensayo de quimioluminiscencia (p.ej. ICL), inmunoensayo ligado a enzimas (EIA), cromatografía de intercambio iónico (IEC), electroforesis capilar y electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser, en las que la HPLC y los inmunoensayos se usan especialmente de manera generalizada en los laboratorios clínicos.

Después de mezclar la composición de la presente invención y la sangre, la concentración en masa del al menos un inhibidor de hexoquinasa es al menos 0,01 mg/mL de sangre, preferiblemente es al menos 0,02 mg/mL de sangre, más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 25 mg/mL de sangre y lo más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 4 mg/mL de sangre, la concentración en masa del al menos un agente inhibidor de la glicolisis es al menos 0,01 mg/mL de sangre, preferiblemente es al menos 0,02 mg/mL de sangre, más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 25 mg/mL de sangre y lo más preferiblemente está en un intervalo de 0,02 a 4 mg/mL de sangre, opcionalmente la concentración en masa del anticoagulante opcional es al menos 0,01 mg/mL de sangre, preferiblemente es al menos 0,1 mg/mL de sangre, más preferiblemente está en un intervalo de 0,1 a 25 mg/mL de sangre y lo más preferiblemente está en un intervalo de 1 a 2,5 mg/mL de sangre o 12 a 30 IU/mL de sangre, y preferiblemente la proporción de las concentraciones en masa del al menos un inhibidor de hexoquinasa y el al menos un agente inhibidor de la glicolisis está en un intervalo de 100:1 a 1:100, más preferiblemente está en un intervalo de 50:1 a 1:50, aún más preferiblemente está en un intervalo de 25:1 a 1:25 y lo más preferiblemente está en un intervalo de 10:1 a 1:10. Preferiblemente, la sangre completa se mezcla, y preferiblemente se determina la glucosa plasmática, el lactato plasmático y la homocisteína plasmática, respectivamente. El uso del análisis de sangre completa y plasma en vez de suero es ventajoso, ya que no es necesario esperar un tiempo para la

coagulación, hay más material de muestra y no hay artefactos originados por los efectos de la coagulación, tal como hemolisis ligera o coagulación en curso tras la centrifugación. Los niveles sustancialmente constantes son preferiblemente niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 4 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 8 % para lactato, más preferiblemente son niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 3 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 5 % para lactato, aún más preferiblemente son niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 2 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 4 % para lactato, aún más preferiblemente son niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 1,5 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 3 % para lactato, y lo más preferiblemente son niveles que tienen una variación dependiente del tiempo como máximo del 1 % para glucosa y homocisteína y como máximo del 2 % para lactato.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende el dispositivo de recogida de sangre de la presente invención y sustancias de ensayo para la determinación de al menos uno, opcionalmente todos simultáneamente, de glucosa, lactato y homocisteína y opcionalmente un componente sanguíneo adicional en la sangre recogida.

Un aspecto adicional de la invención es una composición como se expuso en cualquiera de los puntos (1) a (8) para la estabilización de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína en sangre.

En una realización, el al menos un agente inhibidor de la glicolisis ii) es  $\text{NH}_4\text{F}$ . La aportación de  $\text{NH}_4\text{F}$  es especialmente eficaz porque el ión fluoruro puede contribuir a la inhibición de la glicolisis, mientras de manera ventajosa al mismo tiempo el ión amonio puede contribuir a inhibir la hemolisis. En particular, la sal de fluoruro es preferiblemente fluoruro de amonio, ya que el fluoruro de amonio puede minimizar los cambios de osmolaridad y puede evitar la salida de agua de las células sanguíneas. Así, se puede inhibir un posible efecto de dilución y un posible deterioro de la integridad celular debido a la deshidratación de las células sanguíneas.

En otro aspecto, la presente invención describe el uso de al menos un agente inhibidor de la glicolisis para la estabilización y determinación *ex vivo* de homocisteína en sangre tras la extracción, en el que el al menos un agente inhibidor de la glicolisis tiene preferiblemente actividad hacia una enzima implicada en el catabolismo de la glucosa, más preferiblemente tiene actividad antiglicolítica hacia cualquiera de las enzimas de la ruta glicolítica, y lo más preferiblemente es al menos un inhibidor de hexoquinasa.

Sorprendentemente, en la presente invención se descubrió que el uso de al menos un agente inhibidor de la glicolisis, y en particular las combinaciones de agentes según la presente invención, no solamente estabiliza glucosa y lactato, sino también homocisteína, que es un componente del metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre. De manera inesperada, la inhibición suficiente y mejorada de la glicolisis inhibe los procesos metabólicos que conducen a la formación *ex vivo* de homocisteína, lo que supuestamente implica un cambio o una inhibición de los procesos metabólicos intracelulares dependientes de ATP, tales como las reacciones de transmetilación de los precursores de homocisteína.

En la presente invención se considera que agentes particulares pueden tener una multitud de funciones y efectos. Por ejemplo, un agente antiglicolítico puede inhibir y/o estimular varias enzimas implicadas en el catabolismo de la glucosa al mismo tiempo, o también inhibir la hemolisis. Se entiende que tales bi- o multi-funcionalidades están incluidas en la presente invención. Sin embargo, en las realizaciones típicas y normalmente aplicadas de la presente invención, cada uno de estos agentes es específico y monofuncional hacia la enzima respectiva, es decir, hay presente al menos un compuesto para el componente i), al menos otro compuesto para el componente ii), y opcionalmente de nuevo otro compuesto para el componente opcional iii) de la composición, tal como se expone en la reivindicación 1, mientras además opcionalmente hay presente una sal de amonio  $\text{NR}_4\text{X}$  iv) como se expone en la reivindicación 3.

Los siguientes ejemplos son simplemente ilustrativos de la presente invención, y no se debería considerar que limiten el alcance de la invención de ninguna manera. Los ejemplos y modificaciones u otros equivalentes de los mismos serán evidentes para los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción completa.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la estabilidad de glucosa a temperatura ambiente en sangre completa que contiene A: 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y heparinato de amonio; B: 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y heparinato sódico; C: 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y sal potásica de EDTA; y D: sal potásica de EDTA.

La Fig. 2 representa la estabilidad de lactato a temperatura ambiente en sangre completa que contiene A: 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y heparinato de amonio; B: 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y heparinato sódico; C: 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y sal potásica de EDTA; y D: sal potásica de EDTA.

La Fig. 3 muestra la estabilidad de homocisteína a temperatura ambiente en sangre completa que contiene A: 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y heparinato de amonio; B: 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y heparinato sódico; C: 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y sal potásica de EDTA; y D: sal potásica de EDTA.

## Ejemplos y Ejemplos Comparativos

### Materiales Usados y Método

#### Materiales

5 Yodoacetato, fluoruro de amonio, ácido dicloroacético, ácido 3-bromopirúvico, 2-desoxi-D-glucosa, y oxamato sódico se adquirieron de SIGMA (SIGMA-ALDICH, Alemania).

Los tubos de recogida de sangre con anticoagulantes fueron proporcionados por KABE (KABE Labortechnik GmbH, Alemania).

#### Recogida de Sangre y Protocolo de Muestreo

10 Antes de la recogida de la sangre, se añadieron mezclas particulares de los agentes antiglicolíticos a los tubos de recogida de sangre que contenían anticoagulante. Las concentraciones respectivas de los agentes antiglicolíticos en las mezclas estuvieron en un intervalo de 0,02 mg a 4 mg/mL de la sangre con la que se mezclaron. El anticoagulante usado fue heparinato de amonio, litio o sodio a una concentración de 12,5 IU/mL o ácido etilendiamintetraacético dipotásico (K2EDTA) a una concentración de 2 mg/mL.

15 La sangre se extrajo de voluntarios sanos mediante venopunción de la vena antecubital mediante aspiración. Las muestras de sangre se recogieron en tubos con o sin las mezclas particulares de los agentes antiglicolíticos. Se tuvo cuidado de que todos los tubos se llenasen hasta la marca, y que la sangre se mezclase bien con los agentes invirtiendo los tubos 4 veces inmediatamente tras la recogida de la sangre.

20 Después de mezclar en los tubos la sangre completa con los diferentes agentes antiglicolíticos y/o anticoagulantes, los tubos se almacenaron a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) durante diferentes intervalos de tiempo antes de la centrifugación. Los tubos se centrifugaron 4, 15, 24, 48 y 50 horas tras la recogida de la sangre, y el plasma se almacenó a -20 °C hasta el análisis.

Se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato y homocisteína para las muestras centrifugadas tras los diferentes intervalos de tiempo de almacenamiento.

25 Como control y comparación, se centrifugó una muestra de sangre sin ningún agente antiglicolítico inmediatamente tras la recogida de la sangre, y se separó el plasma en 10 min y se almacenó a -20 °C hasta el análisis. Se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato y homocisteína para esta muestra, y dichas concentraciones se definieron como las concentraciones de referencia a tiempo 0. Se calcularon los porcentajes para las concentraciones dependientes del tiempo de glucosa, lactato y homocisteína respecto de las concentraciones de referencia (valor inicial).

#### 30 Medida de Glucosa

Se usó el método de hexoquinasa en un aparato cobas c (Roche Diagnostics) según el protocolo del fabricante.

#### Medida de Lactato

Se usó un método colorimétrico en un aparato cobas c (Roche Diagnostics). El método se basa en la oxidación de lactato a piruvato mediante una lactato oxidasa.

#### 35 Medida de Homocisteína Total (tHcy)

tHcy se midió mediante un inmunoensayo competitivo en un aparato IMMULITE (SIEMENS, Alemania) y mediante el Kit de Ensayo Enzimático de Homocisteína Diazyme en un aparato cobas c (Roche Diagnostics).

#### Ejemplo 1

40 Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa (2,9 mg/mL de sangre), fluoruro de amonio (2,9 mg/mL de sangre) y un anticoagulante en diferentes soluciones acuosas (los disolventes fueron Disolvente 1: H<sub>2</sub>O; y Disolvente 2: ac. ac. = solución acuosa débilmente acidificada, respectivamente). Tras diferentes intervalos de tiempo, se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato y homocisteína. Los valores determinados se muestran en la Tabla 1 como porcentajes del valor inicial. La combinación de 2-desoxi-D-glucosa y fluoruro de amonio estabilizó glucosa, lactato y homocisteína rápido, de manera eficaz y continuamente.

Tabla 1

		cambios en la concentración plasmática de los analitos intervalos de tiempo (horas)				
analito	disolvente	0	4	15	24	48
glucosa	H <sub>2</sub> O	100	101	101	100	101
glucosa	ac. ac.	100	102	100	102	102
lactato	H <sub>2</sub> O	100	107	107	108	107
lactato	ac. ac.	100	102	104	104	104
homocisteína	H <sub>2</sub> O	100	100	100	102	100
homocisteína	ac. ac.	100	101	101	100	100

5 Para la sangre completa con 2-desoxi-D-glucosa y fluoruro de amonio, se usó respectivamente heparinato de amonio (A), heparinato sódico (B) y sal potásica de EDTA (C) como anticoagulante. Para los anticoagulantes A-C se descubrió que se estabilizó glucosa, lactato y homocisteína rápido, de manera eficaz y continuamente, como se puede observar en la Fig. 1-3.

Ejemplo 2

10 Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa (2,9 mg/mL de sangre), yodoacetato sódico (1,13 mg/mL de sangre) y un anticoagulante en diferentes soluciones acuosas (los disolventes fueron Disolvente 1: H<sub>2</sub>O; y Disolvente 2: ac. ac. = solución acuosa débilmente acidificada, respectivamente). Tras diferentes intervalos de tiempo, se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato y homocisteína. Los valores determinados se muestran en la Tabla 2 como porcentajes del valor inicial. La combinación de 2-desoxi-D-glucosa y yodoacetato sódico estabilizó glucosa, lactato y homocisteína rápido, de manera eficaz y continuamente.

15 Tabla 2

		cambios en la concentración plasmática de los analitos intervalos de tiempo (horas)				
analito	disolvente	0	4	15	24	48
glucosa	H <sub>2</sub> O	100	100	100	101	100
glucosa	ac. ac.	100	101	102	101	101
lactato	H <sub>2</sub> O	100	97	97	98	97
lactato	ac. ac.	100	101	102	101	101
homocisteína	H <sub>2</sub> O	100	100	100	101	100
homocisteína	ac. ac.	100	103	103	101	103

Ejemplo 3

20 Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa (2,9 mg/mL de sangre), oxamato sódico (1,25 mg/mL de sangre) y un anticoagulante en una disolución acuosa débilmente acidificada como disolvente. Tras diferentes intervalos de tiempo, se determinaron las concentraciones de glucosa y homocisteína. Los valores determinados se muestran en la Tabla 3 como porcentajes del valor inicial. La combinación de 2-desoxi-D-glucosa y oxamato sódico estabilizó la glucosa y la homocisteína rápido, de manera eficaz y continuamente.

Tabla 3

analito	cambios en la concentración plasmática de los analitos intervalos de tiempo (horas)				
	0	4	15	24	48
glucosa	100	100	100	100	100
homocisteína	100	102	108	112	112

Ejemplo 4

5 Se añadió sangre completa a ácido 3-bromopirúvico (2,5 mg/mL de sangre), yodoacetato sódico (1,13 mg/mL de sangre) y un anticoagulante en agua y solución acuosa débilmente acidificada como disolvente, respectivamente. Tras diferentes intervalos de tiempo, se determinaron las concentraciones de glucosa. Los valores determinados se muestran en la Tabla 4 como porcentajes del valor inicial. La combinación de ácido 3-bromopirúvico y yodoacetato sódico estabilizó la glucosa rápido, de manera eficaz y continuamente.

Tabla 4

disolvente	cambios en la concentración plasmática de glucosa intervalos de tiempo (horas)				
	0	4	15	24	48
H <sub>2</sub> O	100	100	101	100	100
ac. ac.	100	104	104	104	104

10 Ejemplo 5

15 Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa (2,9 mg/mL de sangre), fluoruro de amonio (2,9 mg/mL de sangre), oxamato sódico (0,81 mg/mL de sangre) y un anticoagulante en una solución acuosa débilmente acidificada como disolvente. Tras diferentes intervalos de tiempo, se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato y homocisteína. Los valores determinados se muestran en la Tabla 5 como porcentajes del valor inicial. La combinación de 2-desoxi-D-glucosa, fluoruro de amonio y oxamato sódico estabilizó glucosa, lactato y homocisteína rápido, de manera eficaz y continuamente.

Tabla 5

analito	cambios en la concentración plasmática de los analitos intervalos de tiempo (horas)				
	0	4	15	24	48
glucosa	100	102	102	103	102
lactato	100	96	96	96	97
homocisteína	100	104	103	104	103

Ejemplo 6

20 Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa (2,9 mg/mL de sangre), yodoacetato sódico (1,2 mg/mL de sangre), oxamato sódico (0,65 mg/mL de sangre) y un anticoagulante en una solución acuosa débilmente acidificada como disolvente. Tras diferentes intervalos de tiempo, se determinaron las concentraciones de glucosa y lactato. Los valores determinados se muestran en la Tabla 6 como porcentajes del valor inicial. La combinación de 2-desoxi-D-glucosa, yodoacetato sódico y oxamato sódico estabilizó la glucosa y el lactato rápido, de manera eficaz y continuamente.

25

Tabla 6

analito	cambios en la concentración plasmática de los analitos intervalos de tiempo (horas)				
	0	4	15	24	48
glucosa	100	102	101	102	102
lactato	100	98	97	98	98

## Ejemplo Comparativo 1

5 Cuando se mezcló sangre completa con sal potásica de EDTA solamente, es decir, sin agente antiglicolítico añadido, no se estabilizaron glucosa, lactato y homocisteína. La concentración de glucosa disminuyó rápidamente y continuamente (véase la Fig. 1), mientras las concentraciones de lactato y homocisteína se incrementaron rápidamente y continuamente (véanse las Figs. 2-3).

## Ejemplo Comparativo 2

10 Se añadió sangre completa a tubos de recogida de sangre Sarstedt que contenían fluoruro sódico y oxalato potásico. Tras diferentes intervalos de tiempo, se determinaron las concentraciones de glucosa y lactato. Los valores determinados se muestran en la Tabla 7 como porcentajes del valor inicial. Las concentraciones de glucosa y lactato no se estabilizaron suficientemente, en cualquier caso notablemente menos que en los Ejemplos según la presente invención. La concentración de glucosa disminuyó significativamente y continuamente, mientras la concentración de lactato se incrementó significativamente y continuamente.

Tabla 7

analito	cambios en la concentración plasmática de los analitos intervalos de tiempo (horas)				
	0	4	15	24	48
glucosa	100	96	94	92	91
lactato	100	106	110	113	116

15

## Ejemplo Comparativo 3

20 Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa (2,9 mg/mL de sangre) y un anticoagulante en una solución acuosa débilmente acidificada como disolvente. Tras diferentes intervalos de tiempo, se determinaron las concentraciones de glucosa y homocisteína. Los valores determinados se muestran en la Tabla 8 como porcentajes del valor inicial. Las concentraciones de glucosa y homocisteína no se estabilizaron suficientemente. La concentración de glucosa disminuyó significativamente y continuamente, mientras la concentración de homocisteína se incrementó significativamente y continuamente.

Tabla 8

analito	cambios en la concentración plasmática de los analitos intervalos de tiempo (horas)				
	0	4	15	24	48
glucosa	100	87	85	80	80
homocisteína	100	102	106	117	117

## 25 Ejemplo Comparativo 4

Se añadió sangre completa a ácido 3-bromopirúvico (2,5 mg/mL de sangre) y un anticoagulante en una solución acuosa débilmente acidificada como disolvente. Tras diferentes intervalos de tiempo, se determinaron las

concentraciones de glucosa y homocisteína. Los valores determinados se muestran en la Tabla 9 como porcentajes del valor inicial. Las concentraciones de glucosa y homocisteína no se estabilizaron suficientemente. La concentración de glucosa disminuyó significativamente y continuamente, mientras la concentración de homocisteína se incrementó significativamente y continuamente.

5 Tabla 9

analito	cambios en la concentración plasmática de los analitos intervalos de tiempo (horas)				
	0	4	15	24	48
glucosa	100	90	89	88.8	88
homocisteína	100	101	111	111	111

10 Una comparación de los Ejemplos con los Ejemplos Comparativos muestra que las composiciones según la presente invención estabilizan glucosa, lactato y homocisteína rápido, de manera eficaz y continuamente, mientras las composiciones que no contienen las combinaciones particulares de los agentes según la presente invención son insuficientes para estabilizar glucosa, lactato y homocisteína, incluso cuando se usan agentes que inhiben la hexoquinasa, tales como 2-desoxi-D-glucosa (véase el Ejemplo Comparativo 3) y ácido 3-bromopirúvico (véase el Ejemplo Comparativo 4) solamente.

Ejemplos 7-13 y Ejemplo Comparativo 5

15 Se ensayó la hemólisis *in vitro* en muestras de sangre incubadas a temperatura ambiente (22 °C-25 °C) determinando la concentración de hemoglobina libre en plasma (g/L) a lo largo del tiempo (0-50 horas), en la que las muestras de sangre se mezclaron con las diferentes composiciones.

Ejemplo 7: Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa, yodoacetato sódico, oxamato sódico y K<sub>3</sub>EDTA.

Ejemplo 8: Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa, sal de amonio de ácido yodoacético, oxamato sódico y K<sub>3</sub>EDTA.

20 Ejemplo 9: Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa, yodoacetato sódico, sal de amonio de ácido oxámico y K<sub>3</sub>EDTA.

Ejemplo 10: Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa, yodoacetato sódico, oxamato sódico, K<sub>3</sub>EDTA y cloruro de tetraetilamonio.

25 Ejemplo 11: Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa, yodoacetato sódico, oxamato sódico, K<sub>3</sub>EDTA y fluoruro de tetrametilamonio.

Ejemplo 12: Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa, yodoacetato sódico, oxamato sódico, K<sub>3</sub>EDTA y cloruro de tetrametilamonio.

Ejemplo 13: Se añadió sangre completa a 2-desoxi-D-glucosa, yodoacetato sódico, oxamato sódico, K<sub>3</sub>EDTA y cloruro de amonio.

30 Ejemplo Comparativo 5: Se añadió sangre completa a K<sub>3</sub>EDTA.

Las concentraciones de los agentes antiglicolíticos en las mezclas fueron 0,1-4 mg/mL de sangre. En los casos de los Ejemplos 10-13, se añadieron 0,5-1 µmol de las sales de amonio respectivas por mL de sangre a la mezcla.

Tabla 10

	Concentración de hemoglobina libre en plasma (g/L) intervalos de tiempo (horas)			
	0	1,5	3,5	50
Ejemplo Comparativo 5	0,290	0,290	0,300	0,370
Ejemplo 7	0,270	0,275	0,290	0,330
Ejemplo 8	0,200	0,210	0,210	0,210
Ejemplo 9:	0,245	0,250	0,250	0,250



## ES 2 656 092 T3

Ejemplo 10	0,150	0,150	0,154	0,160
Ejemplo 11	0,220	0,220	0,230	0,232
Ejemplo 12	0,280	0,280	0,280	0,280
Ejemplo 13	0,290	0,290	0,290	0,290

El Ejemplo Comparativo 5 muestra que cuando la sangre completa se mezcla solamente con  $K_3EDTA$ , se da un grado significativo de hemolisis a lo largo de tiempo, como se observa en el incremento de la concentración de hemoglobina libre en plasma a las 3,5 horas y especialmente a las 50 horas.

- 5 En el Ejemplo 7, que no contiene sal de amonio, también se observa hemolisis, pero en menor grado a las 50 horas en comparación con el Ejemplo Comparativo 5.

Los Ejemplos 8-9 demuestran que cuando la combinación de agentes antiglicolíticos comprende las sales, la hemolisis se puede inhibir significativamente de manera inesperada y ventajosa proporcionando al menos una sal de dichos agentes en forma de una sal de amonio.

- 10 Sorprendentemente, la hemolisis también se puede inhibir de manera eficaz y efectiva añadiendo a la composición como componente adicional una sal de amonio, como se muestra en los Ejemplos 10-13.

Por lo tanto, la aportación de una sal de amonio, como uno o más de los agentes antiglicolíticos según la invención y/o como aditivo adicional, proporciona beneficios adicionales significativos. Se estabiliza(n) uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína, preferiblemente todos, en la muestra de sangre, mientras además se puede incrementar significativamente la inhibición de la hemolisis. Esta estabilización y conservación especialmente ventajosa de las muestras de sangre, a su vez, puede facilitar una determinación mejorada de los componentes de la sangre y diagnósticos fiables.

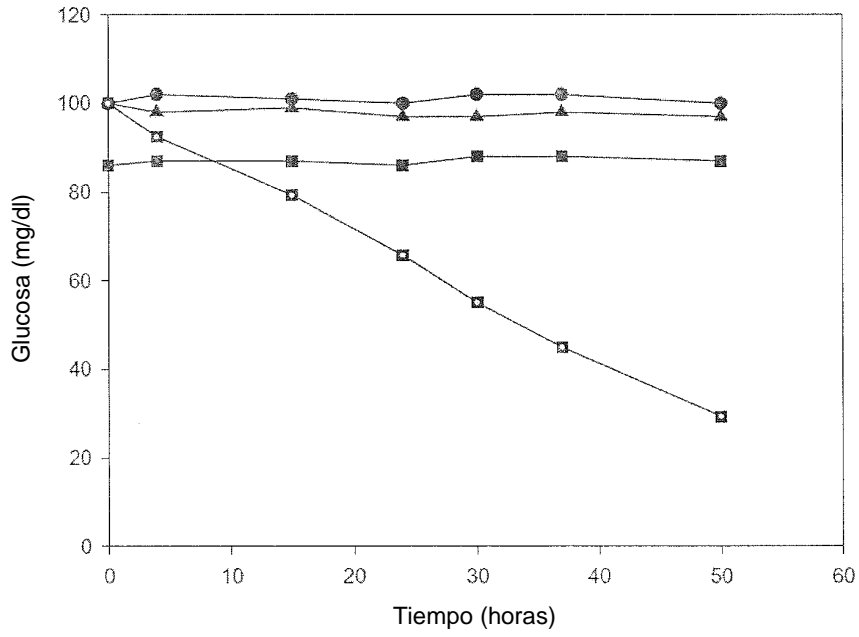
- 15

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento de una muestra de sangre *in vitro*, en el que la sangre se mezcla *in vitro* con una composición que comprende
- 5 i) al menos un inhibidor de hexoquinasa, seleccionado del grupo que consiste en 2-desoxi-D-glucosa, 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa, 2-amino-2-desoxi-D-glucosa y ácido 3-bromopirúvico o una sal del mismo, con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre;
- 10 ii) al menos un agente inhibidor de la glicolisis que tiene actividad hacia otra enzima implicada en el catabolismo de la glucosa, que tiene actividad antiglicolítica hacia cualquiera de las enzimas de la ruta glicolítica posteriores a la hexoquinasa, y seleccionado del grupo que consiste en sal de fluoruro, ácido yodoacético o una sal del mismo, ácido oxámico o una sal del mismo y ácido dicloroacético o una sal del mismo, con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre; y
- opcionalmente iii) un anticoagulante y/o un estabilizante del plasma seleccionado del grupo que consiste en sal de EDTA, sal de citrato, sal de oxalato y sal de heparina, con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre, y
- 15 en el que dicha muestra de sangre se conserva para el análisis posterior.
2. El método según la reivindicación 1, en el que se estabiliza(n) uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína en la muestra de sangre, preferiblemente se estabiliza glucosa.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la composición comprende además
- 20 iv) sal de amonio  $\text{NR}_4\text{X}$ ,
- en el que cada R es independientemente hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  lineal, alquilo  $\text{C}_3\text{-C}_6$  ramificado, fenilo sin sustituir o fenilo sustituido, y X es haluro, hidróxido, alcóxido  $\text{C}_1\text{-C}_4$  y acetato, y en el que preferiblemente cada R es independientemente hidrógeno, metilo o etilo, y X es fluoruro o cloruro, y en el que más preferiblemente  $\text{NR}_4\text{X}$  es fluoruro de tetrametilamonio, cloruro de tetrametilamonio, cloruro de tetraetilamonio o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
- 25 4. El método según la reivindicación 3, en el que la sal tal como se expone en la reivindicación 3 es sal de  $\text{NR}_4^+$ , en el que cada R es independientemente hidrógeno, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  lineal, alquilo  $\text{C}_3\text{-C}_6$  ramificado, fenilo sin sustituir o fenilo sustituido, y en el que preferiblemente cada R es independientemente hidrógeno, metilo o etilo, y en el que más preferiblemente  $\text{NR}_4^+$  es ión de tetrametilamonio, ión de tetraetilamonio o  $\text{NH}_4^+$ , y en el que lo más preferiblemente  $\text{NR}_4^+$  es  $\text{NH}_4^+$ .
- 30 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se determina la cantidad de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína en sangre y/u otro(s) componente(s) sanguíneo(s), que comprende las siguientes etapas:
- (a) proporcionar un dispositivo de recogida de sangre que comprende, colocado en el dispositivo, la composición tal como se expuso en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
- 35 (b) colocar sangre en el dispositivo de recogida de sangre;
- (c) mezclar la composición tal como se expuso en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con la sangre en el dispositivo de recogida de sangre;
- opcionalmente (d) almacenar la sangre en el dispositivo de recogida de sangre durante un periodo predeterminado de tiempo durante el cual los niveles de glucosa, lactato y homocisteína son sustancialmente constantes; y
- 40 (e) determinar la cantidad de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína y/u otro(s) componente(s) sanguíneo(s) en la muestra de sangre.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se inhibe sustancialmente la lisis de las células sanguíneas, y preferiblemente se inhibe la lisis de las células sanguíneas.
- 45 7. Un método de diagnóstico *in vitro*, en el que se determina(n) la(s) cantidad(es) de componente(s) sanguíneo(s) en una muestra de sangre estabilizada mezclada con la composición tal como se expuso en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se estabiliza uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína, y se lleva a cabo la determinación de la(s) cantidad(es) de el/los componente(s) sanguíneo(s) respectivo(s) mediante el uso de métodos físicos, químicos, enzimáticos y/o inmunológicos convencionales, lo que incluye las combinaciones de los mismos.

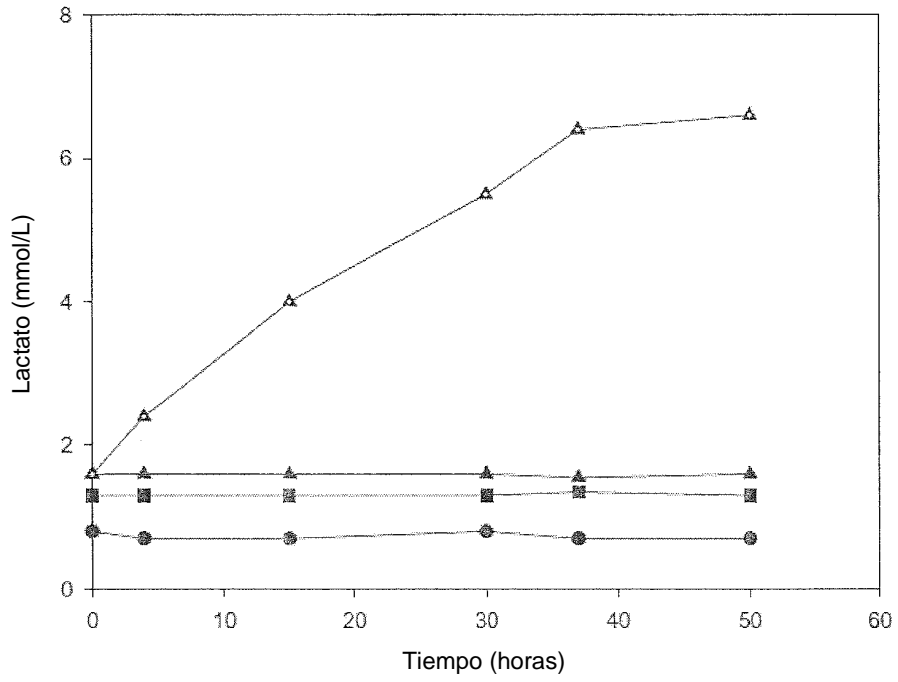
8. El uso de la composición tal como se expuso en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la inhibición de la glicolisis y opcionalmente la coagulación en una muestra de sangre *in vitro*,
- 5 en el que, de manera concurrente o posteriormente al uso de la composición, (a) se lleva(n) a cabo análisis para la determinación de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína y opcionalmente un componente sanguíneo adicional, en el que glucosa, lactato y/u homocisteína se estabilizan a temperatura ambiente durante hasta 50 horas tras la recogida de la sangre.
9. Un dispositivo de recogida de sangre que comprende la composición como se expuso en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
10. Un kit que comprende:
- 10 el dispositivo de recogida de sangre según la reivindicación 9, y sustancias de ensayo para la determinación de al menos uno, opcionalmente todos simultáneamente, de glucosa, lactato y homocisteína y opcionalmente un componente sanguíneo adicional en la sangre recogida.
11. Una composición como se expuso en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la estabilización de uno y/o más de glucosa, lactato y homocisteína en sangre.
- 15 12. Una composición tal como se expuso en la reivindicación 11, en la que el al menos un agente inhibidor de la glicolisis ii) es  $\text{NH}_4\text{F}$ .
- 20 13. El uso de al menos un agente inhibidor de la glicolisis para la estabilización y determinación *ex vivo* de homocisteína en sangre tras la extracción, en el que el al menos un agente inhibidor de la glicolisis preferiblemente tiene actividad hacia una enzima implicada en el catabolismo de la glucosa, y se selecciona del grupo que consiste en sal de fluoruro, ácido yodoacético o una sal del mismo, ácido oxámico o una sal del mismo y ácido dicloroacético o una sal del mismo, con una concentración en masa de al menos 0,01 mg/mL de sangre.

Fig. 1



- A: 2-DG - NH<sub>4</sub>F - NH<sub>4</sub>Heparina
- B: 2-DG - NH<sub>4</sub>F - NaHeparina
- ▲ C: 2-DG - NH<sub>4</sub>F - KEDTA
- ▲ D: KEDTA - Sangre sin agente antiglicolítico

Fig. 2



- A: 2-DG - NH<sub>4</sub>F - NH<sub>4</sub>Heparina
- B: 2-DG - NH<sub>4</sub>F - NaHeparina
- ▲ C: 2-DG - NH<sub>4</sub>F - KEDTA
- ▲ D: KEDTA - Sangre sin agente antiglicolítico

Fig. 3

