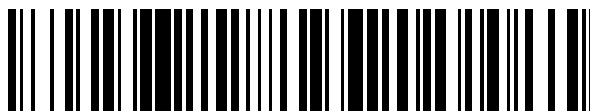


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 512**

51 Int. Cl.:

A61B 5/15

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2012 PCT/US2012/045243**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13006550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2012 E 12737660 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2729068**

54 Título: **Agentes que controlan la coagulación y dispositivos que comprenden los mismos**

30 Prioridad:

05.07.2011 US 201161504496 P

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

11.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MONROE, DOUGALD;
NOVARRA, SHABAZZ;
HOKE, RANDAL, ALAN;
HOLMES, PAUL, F. y
DUDARONEK, JUSTYNA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 703 512 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

Agentes que controlan la coagulación y dispositivos que comprenden los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

El suero es la parte líquida de la sangre completa que permanece después de que se permita coagular la sangre. Desprovistos del suero están los componentes de la sangre completa que se consumen o atrapan durante el proceso de coagulación, es decir, los glóbulos rojos, los glóbulos blancos, las plaquetas y los factores de coagulación de la sangre. Por tanto, el suero incluye todas las proteínas no usadas durante la coagulación y también incluye azúcares, grasas, enzimas, anticuerpos, antígenos, hormonas, partículas cargadas (es decir, electrolitos) y sustancias exógenas (por ejemplo, fármacos y microorganismos). Por tanto, el suero es el sustrato de prueba preferente sobre el que realizar pruebas clínicas usadas para diagnosticar y seguir la función muscular y de órganos, equilibrios metabólicos, y funciones fisiológicas básicas. El suero también se prefiere para realizar otras pruebas analíticas tal como ensayos de enzimas, electrolitos, proteínas y glucosa ya que la interferencia de sustancias no deseadas se ha eliminado a través del proceso de coagulación.

El suero se obtiene por centrifugación de sangre coagulada. En el pasado, la producción de suero a partir de sangre completa ha sido un proceso pasivo en el que la sangre recién recogida se añade a un tubo de ensayo de vidrio y se deja coagular. Alternativamente, otros tubos de suero pueden contener sílice o ácido elálgico para estimular la cascada de coagulación. La sangre, una vez retirada del cuerpo, tiene una tendencia natural a coagular y su exposición a una superficie tal como vidrio fomenta la coagulación de una manera más eficaz. El contacto con una superficie de vidrio produce la activación de factores de coagulación que interaccionan en un mecanismo comúnmente denominado la cascada de coagulación. En este proceso, un factor de coagulación inactivo se convierte químicamente a una enzima activa que posteriormente convierte aún otro precursor inactivo. El resultado final de la cascada de coagulación es una conversión de la proteína soluble en plasma fibrinógeno, a una proteína insoluble, fibrina, por lo cual el coágulo de fibrina atrapa los glóbulos blancos, glóbulos rojos, y plaquetas formando una masa gelatinosa sólida. Las sustancias no consumidas en el proceso, tal como las descritas anteriormente, permanecen libres de la masa gelatinosa y se encuentran en la matriz líquida, es decir, el suero.

El proceso de coagulación pasivo descrito anteriormente produce varios problemas. Mientras que la sangre de individuos sanos normales puede coagular en 30 minutos o más en un tubo de ensayo de vidrio, la sangre de individuos enfermos que pueden tener deficiencias de proteínas de coagulación o de pacientes que reciben terapia de anticoagulación (es decir, anticoagulantes orales o heparina) puede requerir un tiempo extenso para coagular (es decir, 2-8 horas). Por consiguiente, ha habido un retraso asociado con la obtención de muestras de sangre y la realización de las pruebas analíticas, afectando de esta manera la capacidad del médico clínico para proporcionar rápidamente cuidado óptimo al paciente. Además, la sangre de individuos con deficiencias de proteínas de coagulación o pacientes que reciben terapia de anticoagulación puede no formar nunca una masa de fibrina completa y adecuada. Por ejemplo, la coagulación incompleta en muestras de sangre heparinizada produce un sustrato de suero de mala calidad sobre el que realizar la prueba química. Además, el suero de sangre anticoagulada con heparina, que puede no haber coagulado inicialmente, puede empezar a coagular una vez colocada en el dispositivo analítico, obstruyendo de esta manera el sistema y produciendo una parada del instrumento.

Para mejorar la predictibilidad y uniformidad del proceso de formación del coágulo, los técnicos han añadido rutinariamente el agente que fomenta la coagulación trombina y/o una enzima estrechamente relacionada con actividad "de tipo trombina" (por ejemplo, batroxobina) a la muestra de sangre. La trombina convierte activamente el fibrinógeno a fibrina, formando de esta manera el coágulo de forma más eficaz que el proceso de coagulación activado por vidrio más lento. Una desventaja para usar trombina y/o otra enzima en un tubo de recogida de sangre es que estas proteínas no son tan estables como los activadores de la ruta por contacto basados en sílice. Por ejemplo, la exposición a humedad y temperaturas elevadas puede inactivar la trombina. Sin embargo, los métodos basados en sílice con frecuencia han fracasado para dar coagulación completa de la sangre produciendo un material parcialmente coagulado que podría interferir con las pruebas de muestras de sangre tal como suero obtenido de sangre completa.

El documento US5634474 A divulga un montaje de recogida de sangre que comprende un tubo que tiene un extremo abierto que está cubierto por un tapón perforable. El montaje incluye un inserto silíceo activador de la coagulación que activa la cascada de coagulación sin la necesidad de activadores de coagulación o aglutinantes particulados o solubles. Se puede incluir un procoagulante, por ejemplo, trombina, para aumentar el efecto activador de la coagulación del inserto. Se pueden usar aditivos tal como un gel tixotrópico.

60 **Breve compendio de la invención**

En el presente documento se divulga un envase estéril y al vacío para recoger suero, que comprende un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define una parte de depósito para recibir la sangre, en donde el depósito comprende trombina y al menos un agente que controla la coagulación, y un cierre perforable por una aguja para suministrar sangre al depósito.

El al menos un agente que controla la coagulación es un ácido policarboxílico que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol. En algunas formas de realización, el ácido policarboxílico es citrato o isocitrato ("citrato"). En formas de realización adicionales, la concentración del agente que controla la coagulación ácido policarboxílico varía desde 0,5 mM a 100 mM de formulación concentrada. En aun otras formas de realización, la concentración del agente que

5 controla la coagulación ácido policarboxílico varía desde 1 mM a 50 mM de formulación concentrada.

En otra forma de realización, el envase comprende además un envase de recogida que comprende además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua y un azúcar. En otra forma de realización, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en polivinilpirrolidona, polisacáridos y polietilenglicol.

10 En una forma de realización adicional, el azúcar se selecciona del grupo que consiste en dextrano, trehalosa, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y sorbitol.

En otra forma de realización, el envase comprende además un elemento separador. En una forma de realización más, el elemento separador comprende un elemento separador mecánico. En otra forma de realización, el elemento separador comprende una composición en gel. En una forma de realización adicional, la composición en gel comprende un gel tixotrópico. En aún una forma de realización más, la composición en gel está contenida en una cápsula.

15 En otra forma de realización, el envase comprende además sangre recogida.

En otra forma de realización, el envase comprende además sangre recogida.

20 También se divulga en el presente documento un método de recoger sangre que comprende proporcionar un envase que comprende trombina y un agente que controla la coagulación en una concentración suficiente para estabilizar la trombina y/o acelerar su actividad, y añadir al envase una muestra de sangre.

También se divulga en el presente documento un método de recoger sangre que comprende proporcionar un envase que comprende trombina y un agente que controla la coagulación en una concentración suficiente para reducir la concentración de fibrina en una muestra de suero sanguíneo, y añadir al envase una muestra de sangre.

25 También se divulga en el presente documento un método de recoger sangre que comprende proporcionar un envase que comprende trombina y un agente que controla la coagulación en una concentración suficiente para estabilizar la trombina, y añadir al envase una muestra de sangre.

También se divulga en el presente documento un método de recoger sangre que comprende proporcionar un envase que comprende trombina y un agente que controla la coagulación en una concentración suficiente para estabilizar la trombina, y añadir al envase una muestra de sangre.

30 El al menos un agente que controla la coagulación es un ácido policarboxílico que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol. En algunas formas de realización de los métodos anteriormente descritos, el ácido policarboxílico es un citrato. En algunas formas de realización, una concentración del agente que controla la coagulación varía desde 0,5 mM a 100 mM de la formulación concentrada.

En algunas formas de realización de los métodos anteriormente descritos, el envase de recogida comprende además un aditivo seleccionado del grupo previamente descrito que consiste en un polímero soluble en agua y un azúcar.

35 También se divulga en el presente documento un método de recoger sangre que comprende proporcionar un envase que comprende trombina y el agente que controla la coagulación en una concentración suficiente para acelerar la actividad de trombina, y añadir al envase una muestra de sangre.

En el método descrito anteriormente, el método comprende proporcionar al menos uno de un ácido policarboxílico que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol. En algunas formas de realización del método descrito anteriormente, el método comprende además proporcionar tanto un ácido policarboxílico que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol como un inhibidor competitivo débil de trombina en el envase. En algunas formas de realización de los métodos de recogida, el ácido policarboxílico es un citrato como se ha definido previamente en la concentración previamente descrita. En algunas formas de realización, el inhibidor competitivo débil de trombina es una molécula pequeña que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol. En algunas formas de realización, el inhibidor competitivo débil de trombina tiene una constante de inhibición de más de aproximadamente 0,1 micromolar. En algunas formas de realización, el inhibidor competitivo débil de trombina es el compuesto de la previamente descrita fórmula (I). En algunas formas de realización de los métodos de recogida, el agente que controla la coagulación es la para-aminobenzamidina descrita anteriormente en la concentración descrita anteriormente.

40 En algunas formas de realización, el envase de recogida para los métodos de control comprende además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua y un azúcar.

También se divulga en el presente documento un método de recoger sangre que comprende proporcionar un envase que comprende trombina y un agente que controla la coagulación en una concentración suficiente para reducir la concentración de fibrina en una muestra de sangre, y añadir al envase una muestra de sangre.

45 En algunas formas de realización, el envase de recogida para los métodos de control comprende además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua y un azúcar.

También se divulga en el presente documento un método de recoger sangre que comprende proporcionar un envase que comprende trombina y un agente que controla la coagulación en una concentración suficiente para reducir la concentración de fibrina en una muestra de sangre, y añadir al envase una muestra de sangre.

60 El agente que controla la coagulación es un ácido policarboxílico que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol como se ha descrito previamente en la concentración previamente descrita.

El agente que controla la coagulación es un ácido policarboxílico que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol como se ha descrito previamente en la concentración previamente descrita.

65 El agente que controla la coagulación es un ácido policarboxílico que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol como se ha descrito previamente en la concentración previamente descrita.

En algunas formas de realización del método para la recogida, el envase de recogida comprende además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua y un azúcar.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa un envase de recogida adecuado para su uso en la presente invención.

La figura 2 es un gráfico que muestra los efectos de protamina en mitigar la formación de la masa de fibrina.

La figura 3 es un gráfico que muestra la relación entre la concentración de protamina y el tiempo de coagulación.

La figura 4 es un gráfico que ilustra el efecto de protamina sobre la actividad de trombina.

La figura 5 es un gráfico que ilustra el efecto de protamina sobre la actividad de trombina.

La figura 6 es un gráfico que ilustra el efecto de p-aminobenzamidina sobre la actividad de trombina.

La figura 7 es un gráfico que ilustra el efecto de p-aminobenzamidina sobre la actividad de trombina.

Descripción detallada

En el presente documento se describen métodos, dispositivos y kits para aumentar, fomentar, estabilizar, acelerar o controlar la acción de la trombina (de aquí en adelante denominado como “controlar la coagulación”). Mediante aumentar, fomentar o controlar la acción de la trombina, se quiere decir que la sangre se coagularía más completamente y/o más deprisa que una muestra de sangre sola o sangre que contiene la adición de trombina o una sustancia de tipo trombina (de aquí en adelante “trombina”). Más en particular, se describen métodos y dispositivos para estabilizar, acelerar o controlar de otra manera la capacidad de la trombina para convertir el fibrinógeno a fibrina y/o reducir de otra manera la cantidad de fibrina insoluble y/o fibrinógeno en una muestra de sangre (por ejemplo, suero).

Según una forma de realización descrita en el presente documento, es un dispositivo que tiene un envase con (1) una cantidad de trombina (o sustancia de tipo trombina), y (2) una cantidad de al menos un agente que controla la coagulación en el mismo. La trombina y el agente que controla la coagulación están presentes para mezclar con una muestra de sangre, preferiblemente, inmediatamente en su recogida. Sin embargo, cualquiera de la trombina o el agente que controla la coagulación se pueden añadir a la muestra después de su recogida.

Como se usa en el presente documento, el término “muestra de sangre” significa cualquier muestra biológica que contiene al menos algunos componentes de la sangre capaces de coagular. En algunas formas de realización, la muestra de sangre es sangre completa. En otras formas de realización, la muestra de sangre (por ejemplo, suero) deriva de una muestra de sangre completa, por lo cual uno o más componentes de la sangre ya se han eliminado por centrifugación. En aún otras formas de realización, la muestra de sangre es un concentrado de plasma.

El envase puede abarcar cualquier dispositivo de recogida de muestras incluyendo tubos tal como tubos de ensayo y tubos de centrifuga; dispositivos de recogida de sangre de sistema cerrado, tal como bolsas de recogida; jeringas, especialmente jeringas precargadas; catéteres; micropocillos y otras placas de multipocillos; matrices; tubos; recipientes de laboratorio tal como matraces, matraces con rotor, botellas rotatorias, viales, portaobjetos de microscopio, montajes de portaobjetos de microscopio, cubreobjetos, películas y sustratos y montajes porosos; pipetas y puntas de pipetas, etc.; envases de recogida de tejidos y otras muestras biológicas, incluyendo, lancetas, tubos capilares, y productos de la marca Microtainer® disponibles de Becton Dickinson; tubos de recogida de sangre venosa de la marca Vacutainer® disponibles de Becton Dickinson incluyendo esos tubos preempaquetados con trombina; y cualquier otro envase adecuado para contener una muestra biológica, así como envases y elementos implicados en transferir muestras. El agente que controla la coagulación se puede introducir en cualquiera de estos envases siempre que cumplan los criterios esbozados en el presente documento.

El envase puede estar compuesto de (es decir, fabricado de) plástico o vidrio, siempre que cumpla los criterios de la invención. En algunas formas de realización, el envase está compuesto de polipropileno, polietileno, tereftalato de polietileno, poliestireno, policarbonato, materiales celulósicos, politetrafluoroetileno, y otros polímeros fluorados también se pueden usar. En otras formas de realización, el envase está compuesto de poliolefinas, poliamidas, poliésteres, siliconas, poliuretanos, epoxis, acrílicos, poliácridatos, polisulfonas, polimetacrilatos, PEEK, poliimida y fluoropolímeros tales como PTFE Teflon®, FEP Teflon®, Tefzel®, poli(fluoruro de vinilideno), PVDF y resinas perfluoroalcoxi. También se usan productos de vidrio incluyendo vidrio de sílice para fabricar el envase. Un producto de vidrio ejemplar es PYREX® disponible de Corning Glass, Corning, N.Y. También se pueden usar envases cerámicos según formas de realización de la invención. Los productos celulósicos tal como envases de papel y papel reforzado también pueden servir como materiales de envases.

Según una forma de realización de la presente invención, el envase está pretratado con al menos uno de trombina o un agente que controla la coagulación, y está embalado en una forma lista para usar. En otras formas de realización, el envase está pretratado tanto con trombina como con el agente que controla la coagulación. Típicamente, el envase embalado es estéril y también está embalado en materiales de embalaje estériles. La recogida embalada (o "kit") puede contener instrucciones para uso, almacenamiento, envío y/o manejo.

La trombina usada como parte de la presente invención puede ser de cualquier fuente, incluyendo las de orígenes natural y sintético. En algunas formas de realización, se usa trombina bovina. En otras formas de realización, se usa trombina de otras especies. En aun otras formas de realización, se usa trombina recombinante. La trombina recombinante puede estar modificada de modo que tenga estabilidad mejorada o sea resistente a inactivación por otros componentes de la sangre cuando se compara con trombina sin modificar. En formas de realización preferidas, la trombina es alfa trombina. Los expertos en la materia conocen bien la alfa-trombina y se describe en detalle en el presente documento. La concentración de la trombina usada en el envase varía desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 100 unidades (u) por mililitro de volumen de sangre (u/ml). En algunas formas de realización, la concentración de la trombina usada en el envase varía desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 unidades por mililitro de volumen de sangre.

El envase también comprende al menos un agente que controla la coagulación. Sin querer estar unido por ninguna teoría particular, se cree que el agente que controla la coagulación es capaz de alcanzar al menos uno de los siguientes: (1) al menos estabilizar parcialmente la trombina; (2) al menos reducir parcialmente la cantidad de fibrina insoluble y/o fibrinógeno en una muestra de sangre (por ejemplo, suero); o (3) al menos acelerar parcialmente la acción de la trombina.

En otra forma de realización descrita en el presente documento, el agente que controla la coagulación es un compuesto ácido policarboxílico de bajo peso molecular (o una sal del mismo), que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol. Por ejemplo, los compuestos ácido carboxílico adecuados pueden tener la fórmula $C(O)OH-R^1-R^2(C(O)OH)-R^3-C(O)OH$, donde R^1 , R^2 y R^3 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser un grupo alifático o aromático sustituido o sin sustituir, en donde cualquiera de R^1 , R^2 o R^3 pueden contener cualquier número de grupos ácido carboxílico adicionales. En algunas formas de realización, el compuesto ácido carboxílico es citrato de sodio. En otras formas de realización, el compuesto ácido carboxílico es isocitrato.

Sin querer estar unido por ninguna teoría particular, se cree que el citrato estabiliza la alfa-trombina reduciendo la velocidad a la que se corta y convierte a formas menos activas (por ejemplo, beta-trombina o gamma-trombina). Además, y de nuevo sin querer estar unido por ninguna teoría particular, se cree que el citrato es capaz de estabilizar la alfa-trombina comparativamente mejor que alfa-trombina combinada con uno de los tampones TRIS, fosfato, histidina o HEPES.

En una forma de realización, el agente que controla la coagulación citrato se combina con un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en polímeros solubles en agua y azúcares. Los polímeros solubles en agua ejemplares incluyen polivinilpirrolidona, polisacáridos, y polietilenglicol. Los azúcares ejemplares incluyen dextrano, ciclodextrinas, trehalosa, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y sorbitol. En efecto, el/los componente(s) adicional(es) se puede(n) seleccionar de excipientes farmacéuticos comunes que conocen bien los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

Sin querer estar unido por ninguna teoría particular, se cree que el polímero soluble en agua puede actuar como un aglutinante para facilitar la aplicación por rociado de la formulación en la superficie de un dispositivo de recogida de sangre.

En otras formas de realización, el agente que controla la coagulación citrato se combina con un tensioactivo. Los ejemplos del tensioactivos adecuados incluyen los que pertenecen a la clase de compuestos conocidos como "alcóxilatos de siloxano".

En algunas formas de realización, el pH de la solución de citrato con trombina varía entre 5,5 a 7,5.

En algunas formas de realización, el agente que controla la coagulación citrato contiene otras sales, tampones, o proteínas. En otras formas de realización, la solución de citrato está sustancialmente libre de otras sales, tampones o proteínas. En aun otras formas de realización, la solución de citrato está libre de al menos uno de albúmina, cloruro de sodio o TRIS-HCl.

Los expertos en la materia serán capaces de seleccionar una concentración apropiada de un agente que controla la coagulación adecuada para los usos descritos en el presente documento basado en la dirección proporcionada en el presente documento. Por supuesto, pueden ser necesarias diferentes concentraciones del agente que controla la coagulación dependiendo de la cantidad de trombina proporcionada en el tubo de muestra, el tipo de trombina usada, el método de aplicar la formulación al envase, el volumen de la muestra de sangre y el tipo de muestra de sangre recogida. También se pueden usar mezclas de diferentes agentes que controlan la coagulación en concentraciones variables para proporcionar el resultado deseado. Por ejemplo, la trombina se puede combinar tanto con protamina

como un ácido policarboxílico. Como tal, los dispositivos que contienen trombina y el agente que controla la coagulación se pueden personalizar dependiendo del tipo de muestra y uso pretendido.

En algunas formas de realización donde se añade citrato a la formulación que contiene trombina, solo o en combinación con un componente adicional, el citrato está presente en una concentración que varía desde aproximadamente 0,5 mM hasta aproximadamente 100 mM de la formulación de trombina líquida que se va a aplicar (por ejemplo, por rociado) y secar sobre la superficie del dispositivo de recogida de sangre. En otras formas de realización donde se añade citrato a la formulación que contiene trombina, solo o en combinación con un componente adicional, el citrato está presente en una concentración que varía desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM de la formulación de trombina líquida que se va a aplicar (por ejemplo, por rociado) y secar sobre la superficie del dispositivo de recogida de sangre.

Los agentes que controlan la coagulación se pueden usar solos o en combinación con una solución tamponante. Los expertos en la materia conocen bien soluciones tamponantes y se podrían adaptar fácilmente para uso en la presente invención.

El agente que controla la coagulación, trombina y cualquier aditivo o tampón pueden estar localizados en cualquier superficie del envase. La trombina y el agente que controla la coagulación pueden estar localizados en las mismas superficies o en diferentes superficies, se pueden entremezclar, o pueden estar separados entre sí (por conveniencia, cualquier referencia al uso de trombina o el agente que controla la coagulación juntos también se debe asumir que los incluye separados). La trombina y/o el agente que controla la coagulación también pueden estar localizados en tapones y sellos para cerrar tales dispositivos o en insertos mecánicos u otros colocados en tales dispositivos. La trombina y/o agente que controla la coagulación está localizado en cualquier lugar a lo largo de al menos una pared interior del envase o en cualquier sitio en la parte del depósito. La localización de la trombina o el agente que controla la coagulación está determinada por varias variables, incluyendo el modo de aplicación, el agente que controla la coagulación específico usado, el volumen interno y la presión interna del envase, y el volumen de la muestra biológica extraída en el envase.

La trombina, agente que controla la coagulación, y aditivos o tapones, se pueden aplicar al envase por cualquier método conocido en la técnica. La trombina y el agente que controla la coagulación se pueden aplicar por el mismo medio o por medios diferentes. Asimismo, se pueden aplicar juntos o por separado. Por ejemplo, la trombina y/o agente(s) que controla(n) la coagulación, se pueden rociar sobre la superficie (como un líquido, polvo o gel), secar por rociado, dispensar o liofilizar sueltos sobre la superficie de la pared interior del envase. En una forma de realización, la trombina y/o el agente que controla la coagulación está en una solución líquida y se rocía o coloca de otra manera en el envase. Posteriormente, la solución se puede liofilizar por métodos que se conocen en la técnica tal como, por ejemplo, secado por congelación. Por ejemplo, al congelar la solución y después calentar lentamente después de congelar, mientras que al mismo tiempo se aplica vacío, un polvo seco congelado permanece en el tubo de recogida. Un aditivo tal como un excipiente, por ejemplo, PVP o trehalosa, también se puede añadir a la trombina y/o el agente que controla la coagulación antes de la liofilización de modo que el agente estabilizante resultante se forma en pellas en el envase. Alternativamente, la trombina y/o el agente que controla la coagulación, tal como en forma de gel o líquida, se pueden colocar en la parte de depósito del envase. Típicamente, para colocar la cantidad deseada de trombina y/o agente que controla la coagulación en un envase, se reconstituye una forma sólida de la trombina y/o el agente que controla la coagulación y después se dispensa la cantidad apropiada de líquido en el envase. El líquido se puede secar por rociado, colocar en la parte inferior del envase o posteriormente liofilizar. En otro aspecto, la trombina y/o el agente que controla la coagulación se forma en un aerosol líquido o sólido y se rocía sobre una o más superficies del interior del envase.

En algunas formas de realización, el envase es para extraer una muestra de sangre completa directamente de un paciente para coagular una muestra de sangre inmediatamente en el punto de recogida, y así usarse como un tubo de recogida de suero. El dispositivo puede ser un sistema de vacío para recoger sangre. Alternativamente, el dispositivo puede ser un sistema parcialmente de vacío o de no vacío para recoger sangre. Un ejemplo adecuado de un sistema de vacío es un tubo cerrado. Una extracción de jeringa manual es un ejemplo adecuado tanto de un sistema parcialmente de vacío como de no vacío. Los sistemas de no vacío también pueden incluir sistemas de extracción automáticos.

La figura 1 muestra un envase de sangre típico 10, que incluye un envase 12 que define una cámara interna 14. En la forma de realización ilustrada, el envase 12 es un tubo hueco que tiene una pared lateral 16, un extremo inferior cerrado 18 y un extremo superior abierto 20. Opcionalmente, se proporciona un miembro separador 13 en la cámara del envase 14. El miembro separador 13 sirve para ayudar en separar los componentes de la muestra, por ejemplo, por centrifugación. El envase 12 está dimensionado para recoger un volumen adecuado de fluido biológico, preferiblemente sangre. Un cierre 22 para recubrir el extremo abierto 20 para cerrar el envase 12 es preferido donde se demanda un producto estéril. Para tubos convencionales, una tapa de rosca es normalmente suficiente. Para tubos de recogida de vacío, en general se emplea un tapón elastomérico, muy ajustado para contener el vacío durante los períodos de almacenamiento requeridos. El cierre 22 forma un sello capaz de cerrar de forma eficaz el envase 12 y retener una muestra biológica en la cámara 14. El cierre 22 puede ser uno de una variedad de formas incluyendo, pero no limitado a, cierres de goma, cierres HEMOGARD®, sellos metálicos, sellos de goma con bandas metálicas y

sellos de diferentes polímeros y diseños. Una capa protectora 24 puede recubrir el cierre 22. El envase 12 también contiene trombina y/o el agente que controla la coagulación según la presente invención. El envase puede contener uno o ambos de la trombina y/o el agente que controla la coagulación. Por supuesto, el otro de la trombina y/o el agente que controla la coagulación se pueden añadir antes de la recogida de muestras o después de la recogida de muestras.

El envase 12 se puede hacer de vidrio, plástico u otros materiales adecuados descritos en el presente documento. Los materiales plásticos pueden ser materiales impermeables al oxígeno o pueden contener una capa impermeable o semipermeable al oxígeno. Alternativamente, el envase 12 puede estar hecho de un material plástico permeable al agua y el aire.

La presión en la cámara 14 se selecciona para extraer un volumen predeterminado de muestra biológica en la cámara 14. El cierre 22 es tal que puede ser perforado por una aguja 26 u otra cánula para introducir una muestra biológica en el envase 12 como se sabe en la técnica. Preferiblemente, el cierre 22 es resellable. Los materiales adecuados para el cierre 22 incluyen, por ejemplo, goma de silicona, goma natural, goma de halobutilo, goma de estireno butadieno, copolímeros de etileno-propileno y policloropreno.

Los ejemplos adecuados de envase 12 incluyen tubos de pared única y multicapas. Un ejemplo más específico de un envase adecuado 12 se divulga en la patente en los Estados Unidos No. 5.860.937 a Cohen, que se incorpora en el presente documento mediante referencia en su totalidad.

A modo de ejemplo, un proceso útil para hacer los dispositivos según la presente invención implica obtener un envase; añadir trombina y/o el agente que controla la coagulación al envase; secar o liofilizar la trombina y/o el agente que controla la coagulación; hacer el vacío en el envase; y esterilizar el envase. La trombina y/o el agente que controla la coagulación se pueden dispensar en el envase en forma de solución. Antes o después de añadir la trombina y/o el agente que controla la coagulación al envase de recogida, se puede añadir un miembro separador al envase, si se desea. Un ejemplo de un proceso de liofilización/vacío adecuado es como sigue: el envase que tiene trombina y/o el agente que controla la coagulación colocado en el mismo se congela a una temperatura de aproximadamente -40°C a una presión de aproximadamente 760mm durante aproximadamente 6 a 8 horas; el envase se seca según la temperatura aumenta desde -40°C hasta aproximadamente 25°C, a una presión de aproximadamente 0,05mm, durante aproximadamente 8 a 10 horas; y después se hace vacío en el envase a una temperatura de aproximadamente 25°C a una presión de aproximadamente 120mm durante aproximadamente 0,1 horas. En algunas formas de realización, la técnica de esterilización utiliza radiación con cobalto 60.

En algunas formas de realización, se usa un tubo de recogida de muestras que tiene un miembro separador 13 (por ejemplo, un elemento separador mecánico, gel u otro miembro separador incluyendo papel de filtro y similar) para separar componentes sanguíneos. En tal aspecto, el interior del tubo y/o el exterior del miembro separador se puede tratar con la trombina y/o el agente que controla la coagulación. En tales casos, la trombina y/o el agente que controla la coagulación se pueden secar por rociado y/o liofilizar en una superficie exterior del medio de separación.

El envase 12 también puede ser un envase para recogida o preparación de suero sanguíneo. Tal envase comprende, además de la trombina y/o el agente que controla la coagulación, un elemento para separar el suero de la sangre completa humana o animal. El elemento para separar el suero de sangre completa puede ser un miembro separador tal como una formulación en gel o un medio mecánico. En algunas formas de realización, el gel es una formulación de gel tixotrópico polimérico. El gel puede ser un homopolímero o un copolímero y puede incluir geles de poliéster, poliacrílicos o basados en silicona.

Otros tubos de recogida de sangre comercialmente disponibles adecuados para su uso en el presente documento incluyen los siguientes, todos los cuales están vendidos por Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J., todos los registros y marcas comerciales pertenecen a Becton, Dickinson and Company: tubos SST™ de marca VACUTAINER®, incluyendo, pero no limitados a los no. de catálogo 367983, 367977 y 367986; tubos Serum de marca VACUTAINER®, incluyendo, pero no limitados a los no. de catálogo 367812 y 367815; tubos Thrombin de marca VACUTAINER®, incluyendo, pero no limitados a los no. de catálogo 367755 y 366525, tubos RST de marca VACUTAINER®, incluyendo, pero no limitados a los no. de catálogo 368771 o 368774 y cualquiera de los tubos de suero y separadores de suero de la marca MICROTAINER®. Como se ha indicado anteriormente, cualquier dispositivo de recogida adecuado, ya sea de vacío o de no vacío, se contempla para uso con los agentes de coagulación descritos en el presente documento. Por supuesto, los expertos en la materia pueden modificar cualquier envase según la presente invención para hacerlo adecuado para uso.

Según otra forma de realización, un kit tiene al menos dos envases que comprenden trombina y el agente que controla la coagulación descritos en el presente documento. Por ejemplo, el kit tiene un tubo de recogida principal, por ejemplo, un tubo que separa plasma que tiene un elemento separador en el mismo, y un tubo secundario para ensayar, por ejemplo, para verter o dispensar de otra manera el plasma recogido en el tubo de recogida principal. Opcionalmente, el kit podría incluir un dispositivo de transferencia tubo a tubo para prevenir la necesidad para verter u otras prácticas de transferir no seguras, en cuyo caso el tubo secundario estaría a una presión reducida para extraer el plasma. Al usar tal kit se recogería una muestra en el tubo principal, se coagularían los componentes de la sangre con o sin

centrifugación, se transferiría la muestra de interés al tubo de ensayo secundario, y se realizaría el ensayo. El tubo de ensayo secundario podría ser de una variedad de tamaños, dependiendo del ensayo deseado. El kit también podría incluir embalaje y/o instrucciones para el uso.

- 5 En una forma de realización, el kit para recoger y almacenar la muestra biológica tiene un envase principal estéril y al vacío, en donde el envase principal tiene trombina y al menos un agente que controla la coagulación en el mismo y un cierre perforable por una aguja; y un envase secundario, en donde el envase secundario también tiene un agente que controla la coagulación.
- 10 Según otra forma de realización descrita en el presente documento es un método para fomentar o aumentar la coagulación de componentes de la sangre que comprende proporcionar un envase que comprende una trombina y un agente que controla la coagulación en una concentración suficiente (i) para estabilizar y/o acelerar la actividad de la trombina, o (ii) reducir la cantidad de fibrina soluble en la muestra; y añadir al envase una muestra de sangre completa.
- 15 Los métodos ejemplares incluyen obtener una muestra de sangre e introducir la muestra en el envase que comprende trombina y un agente que controla la coagulación. En algunas formas de realización, la muestra de sangre se extrae del paciente directamente en el envase sin ninguna etapa de proceso intermedia. Aunque sin estar apoyado por una teoría particular de operación, se cree que recoger la muestra biológica directamente del paciente, tal como cuando se recoge una muestra de sangre completa, e introducir la muestra directamente en un envase que ya comprende (es decir, pretratado con el agente) la trombina y el agente que controla la coagulación, ayuda sustancialmente en estabilizar o acelerar o controlar de otra manera la acción de la trombina o reducir la cantidad de fibrina soluble presente en la muestra. Los métodos descritos son útiles con cualquiera de los envases, aditivos y anticoagulantes adicionales divulgados en el presente documento.
- 20

25 Ejemplos

Ejemplo 1 (no según la invención): Efecto mitigante de protamina sobre las masas de fibrina en muestras de suero

- 30 Primero se resuspendió sulfato de protamina en ácido clorhídrico aproximadamente 0,5 M a una concentración de aproximadamente 250 mg/ml. Esta solución se tituló después a un pH de aproximadamente 6 con hidróxido de sodio 5 N. Esta titulación a aproximadamente pH 6 se realizó inmediatamente puesto que la exposición prolongada de protamina a bajo pH, se creía, produciría hidrólisis y pérdida de actividad. También se cree que se podrían usar soluciones más diluidas de ácido clorhídrico para preparar la solución de protamina.
- 35 La solución de protamina se mezcló después en una proporción de aproximadamente 1:1 con una solución de aproximadamente 1250 U/ml de trombina en citrato de sodio aproximadamente 40 mM a aproximadamente pH 6,0, que contenía aproximadamente 20 mg/ml de un tensioactivo alcoxilato de siloxano, y 2 mg/ml de polivinilpirrolidona (PVP).
- 40 El reactivo resultante se filtró y roció en dosis de 20 µl en tubos de tereftalato de polietileno (PET) de 13x100 mm. Los tubos se secaron después mediante aire caliente forzado, y se hizo el vacío y se pusieron tapones.
- 45 Los tubos se cargaron con sangre humana recién extraída y se dejó coagular durante entre aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3,5 minutos (aleatorizado) y después se centrifugó. El suero resultante se puntuó por evaluación visual para la presencia de una "masa de fibrina" en el compartimento de suero en una escala de 0 a 3, siendo 3 la más severa. Se demostraron los resultados para "masas de fibrina", como en la figura 2. La ausencia de una masa de fibrina (evaluación de "cero") indicaba que la reacción de coagulación era rápida y completa, precipitando toda la fibrina (fibrinógeno) antes de la etapa de centrifugación.
- 50 Como se muestra en la figura 2, la protamina a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml mejoró el rendimiento del tubo drásticamente. Con la adición de protamina, solo 1 tubo en 8 tuvo una masa de fibrina visible con aproximadamente 5 U/ml o aproximadamente 10 U/ml de trombina. Esto estaba en contraste con los tubos sin protamina donde 7 de 8 tuvieron masas visibles con aproximadamente 5 U/ml de trombina, y 6 de 8 tuvieron masas visibles con aproximadamente 10 U/ml de trombina. Según esto, se cree que la adición de un agente que controla la
- 55 coagulación protamina a un envase de muestra de sangre que también contiene trombina mitigaba la tendencia de formarse de tales masas (atribuibles a la acción incompleta de trombina sobre fibrinógeno antes de la centrifugación).

Ejemplo 2 (no según la invención): La protamina acelera la acción de coagulación de la trombina

- 60 Se mezclaron soluciones de trombina y protamina en aproximadamente 20 mM de citrato a un pH de aproximadamente 6 en una proporción de aproximadamente 1:1 con plasma humano liofilizado comercial reconstituido y se ensayaron en un analizador de coagulación Stago Compact. Los tiempos de coagulación resultantes se midieron como función de la concentración de trombina y protamina para una concentración de trombina determinada. Las concentraciones enumeradas en el gráfico de la figura 3 representan las soluciones de trombina/protamina antes de mezclarlas con el plasma.
- 65

Los resultados mostraron un tiempo de coagulación descendente con concentración de protamina creciente. Como tal, se cree que la adición de una protamina aumenta la actividad de coagulación de la trombina. Sin querer estar unido por ninguna teoría particular, se propone que la protamina aceleró el tiempo de coagulación (1) directamente acelerando la acción enzimática de la trombina; (2) previniendo la inactivación de la trombina por inhibidores endógenos en el plasma; (3) acelerando la precipitación de la fibrina o alguna combinación de estos efectos.

Ejemplo 3 (no según la invención): Resultados de estabilidad acelerada con trombina y protamina

Se preparó una mezcla de trombina (aproximadamente 1250 U/ml), protamina (aproximadamente 125 mg/ml o aproximadamente 62,5 mg/ml) y un tensioactivo alcoxilato de siloxano en citrato aproximadamente 20 mM a un pH de aproximadamente 6,0. Se rociaron aproximadamente 20 µl de esta mezcla en tubos PET de 13x100 mm. Los tubos se secaron mediante aire caliente forzado, se hizo el vacío y se almacenaron en el refrigerador. Al inicio del estudio, los tubos se destaparon y se colocaron en una cámara de entorno controlado previamente equilibrado a aproximadamente 50°C y humedad relativa de aproximadamente el 45%. A varios intervalos de tiempo, los tubos se retiraron y se evaluó la actividad de trombina en el analizador de coagulación Stago Compact. Los resultados se presentan en la figura 4. Las barras de error indican el intervalo de confianza al 95% para la actividad de trombina con 5 replicados. La figura 4 claramente ilustra que la actividad de trombina a lo largo del tiempo era mejor con la protamina que sin ella.

Cuando la actividad de trombina de puntos de tiempos posteriores se normalizó sobre el valor inicial, las curvas resultantes se pudieron usar para comparar la estabilidad relativa de cada formulación (véase la figura 5). De las figuras se observa que las muestras de sangre con formulaciones que contenían sulfato de protamina eran más estables que muestras de sangre combinadas con formulaciones de trombina sin protamina.

Ejemplo 4: Resultados de estabilidad acelerada con trombina y para-aminobenzamidina

El agente que controla la coagulación para-benzamidina se evaluó para determinar si mejoraba la estabilidad de trombina rociada en condiciones de estabilidad acelerada. Sin querer estar unido por ninguna teoría particular, se cree que la para-animobenzamidina estabiliza la trombina secada por rociado en condiciones de humedad extremadamente alta, donde la degradación autolítica de la trombina puede ser rápida, incluso a temperatura ambiente.

Se preparó trombina en citrato o isocitrato aproximadamente 5 mM a un pH de aproximadamente 6,1. Se añadió para-aminobenzamidina a una concentración de aproximadamente 3 mM. Se rociaron aproximadamente 16 µl de esta solución en tubos PET de 13x100 mm. Los tubos se secaron mediante aire caliente forzado, y se hizo el vacío. Los tubos sellados se colocaron después en una cámara de entorno controlado previamente equilibrada a aproximadamente 43°C y humedad relativa de aproximadamente el 75%. A varios intervalos de tiempo, los tubos se retiraron y se evaluó la actividad de trombina en el analizador de coagulación Stago Compact. Los resultados se presentan en la figura 6 y la figura 7. Las barras de error indican el intervalo de confianza al 95% para la actividad de trombina con 5 replicados. Los datos en las figuras indican que el agente que controla la coagulación para-aminobenzamidina conserva la estabilidad de trombina a lo largo del tiempo (comparado con citrato solo) en el producto embalado, antes de uso.

REIVINDICACIONES

1. Un envase para recoger suero que comprende un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define una parte de depósito para recibir la sangre, en donde dicho depósito comprende trombina y al menos un agente que controla la coagulación, y un cierre, en donde dicho agente que controla la coagulación es un compuesto ácido policarboxílico que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol.
2. El envase de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto ácido policarboxílico se selecciona del grupo que consiste en citrato e isocitrato.
3. El envase de la reivindicación 1, en donde una concentración de dicho compuesto ácido policarboxílico varía desde 0,5 mM a 100 mM de formulación concentrada.
4. El envase de la reivindicación 1, en donde una concentración de dicho compuesto ácido policarboxílico varía desde 1 mM a 50 mM de formulación concentrada.
5. El envase de la reivindicación 1, en donde dicho envase comprende además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua y un azúcar.
6. El envase de la reivindicación 5, en donde dicho polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en polivinilpirrolidona, polisacáridos, y polietilenglicol.
7. El envase de la reivindicación 5, en donde dicho azúcar se selecciona del grupo que consiste en dextrano, ciclodextrinas, trehalosa, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y sorbitol.
8. El envase de la reivindicación 1, que comprende además un elemento separador seleccionado del grupo que consiste en una composición en gel y un elemento separador mecánico.
9. El envase de la reivindicación 8, en donde dicha composición en gel comprende un gel tixotrópico.
10. El envase de la reivindicación 1, en donde el cierre es perforable por una aguja y en donde el envase comprende además sangre introducida en el envase a través de una aguja.
11. Un método de recoger sangre que comprende un envase que comprende trombina y un agente que controla la coagulación en donde dicho agente que controla la coagulación es un compuesto ácido policarboxílico que tiene un peso molecular de menos de 500 g/mol en una concentración suficiente para estabilizar la trombina, y añadir al envase una muestra de sangre.
12. El método de la reivindicación 11, en donde dicho compuesto ácido policarboxílico se selecciona del grupo que consiste en citrato e isocitrato.
13. El método de la reivindicación 11, en donde una concentración de dicho compuesto ácido policarboxílico varía desde 0,5 mM a 100 mM de formulación concentrada.
14. El método de la reivindicación 11, en donde dicho envase comprende además un aditivo seleccionado del grupo que consiste en un polímero soluble en agua y un azúcar.
15. El método de la reivindicación 11, en donde dicho envase comprende además un elemento separador.

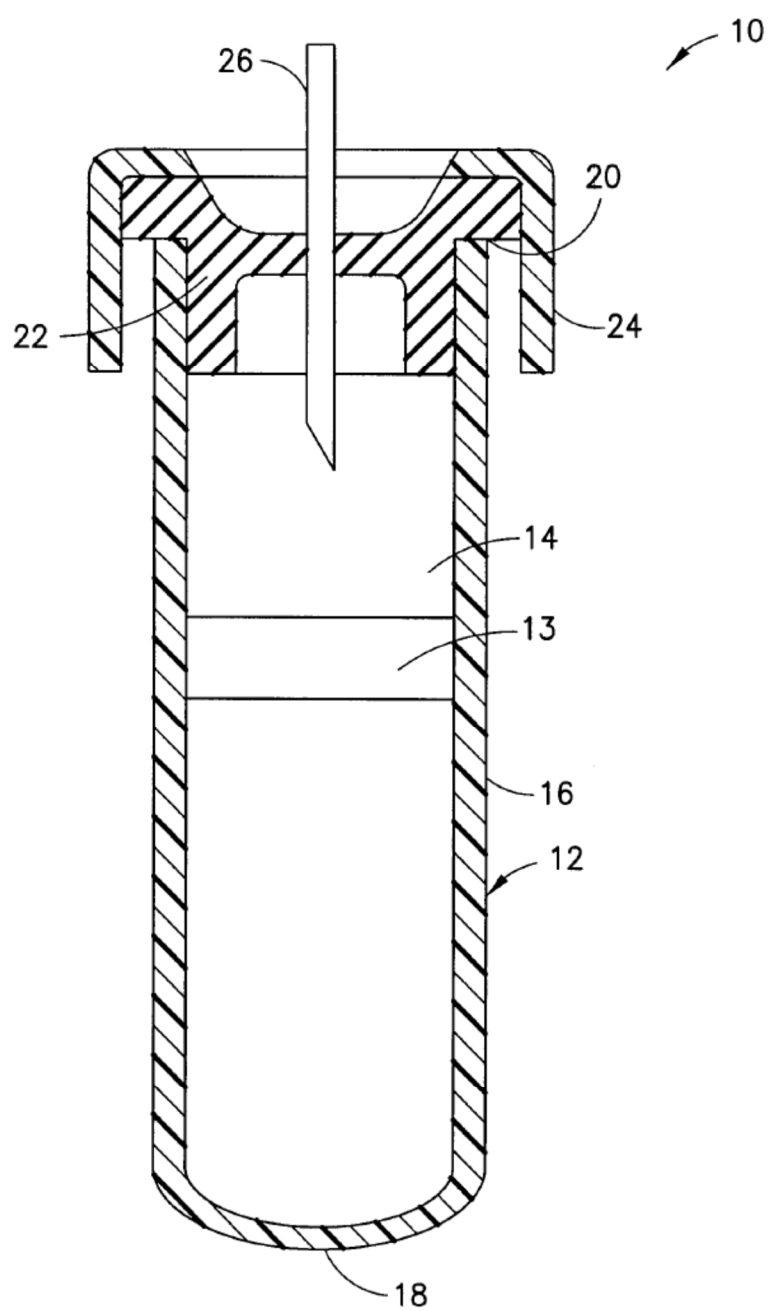


FIG.1

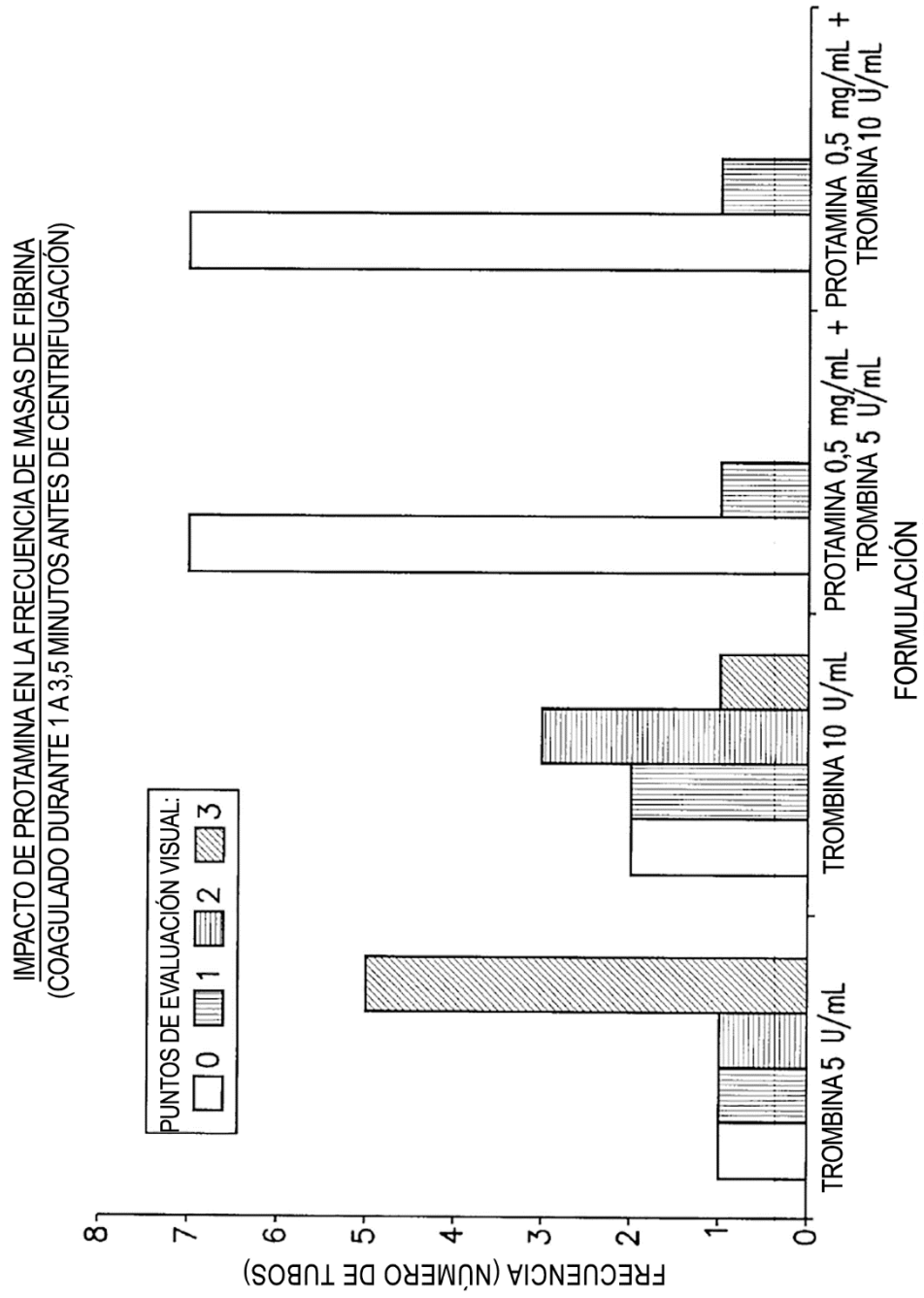


FIG.2

ESTIMULACIÓN CON SULFATO DE PROTAMINA DE COAGULACIÓN MEDIADA POR TROMBINA

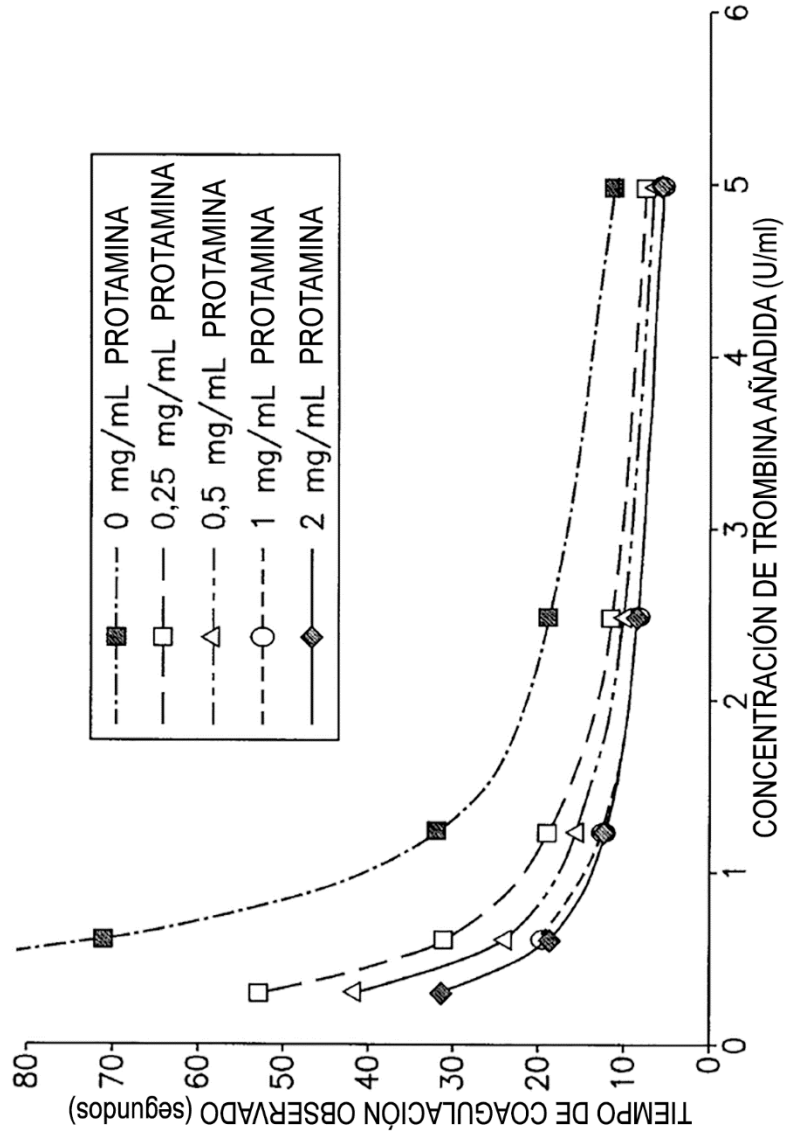


FIG.3

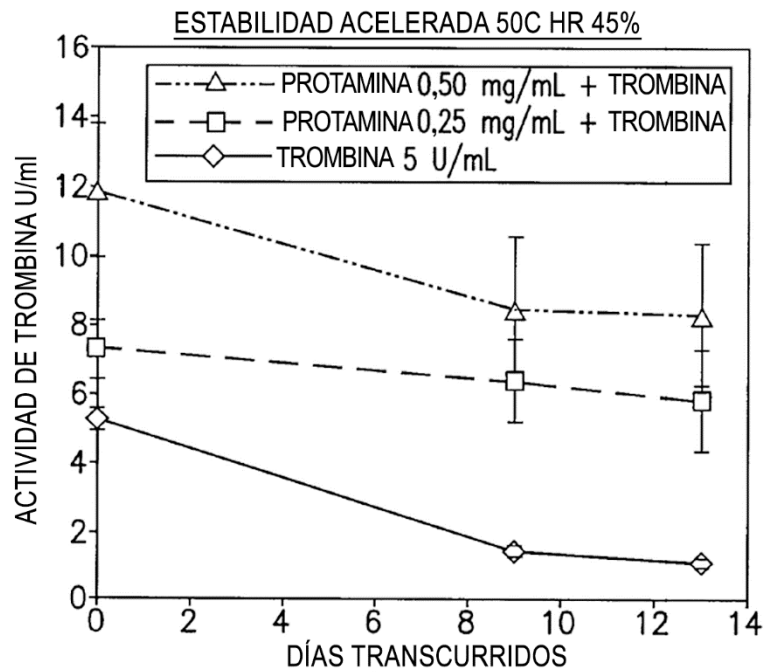


FIG.4

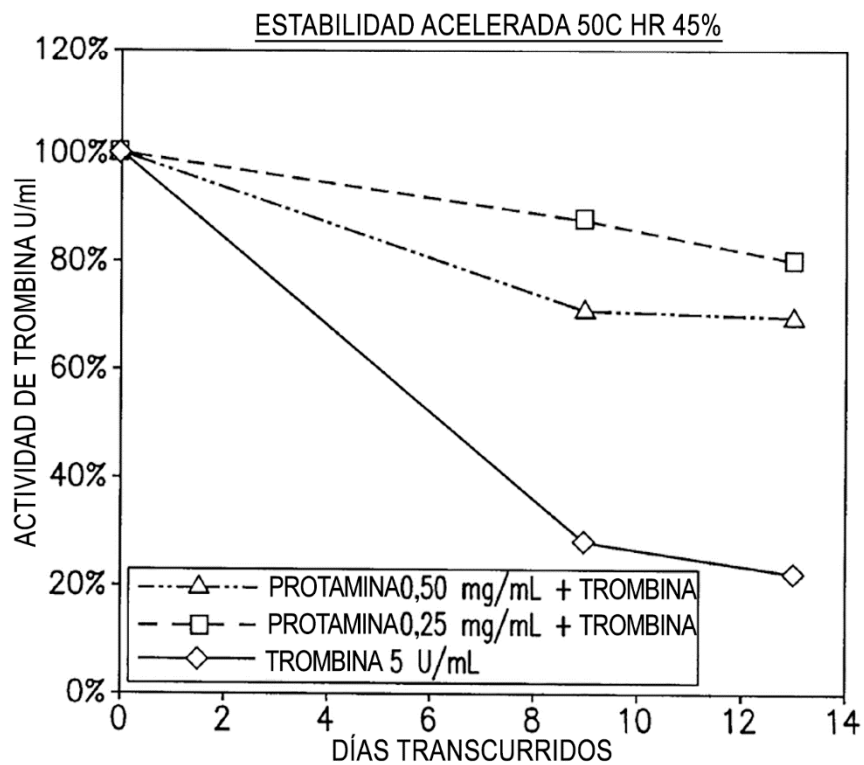


FIG.5

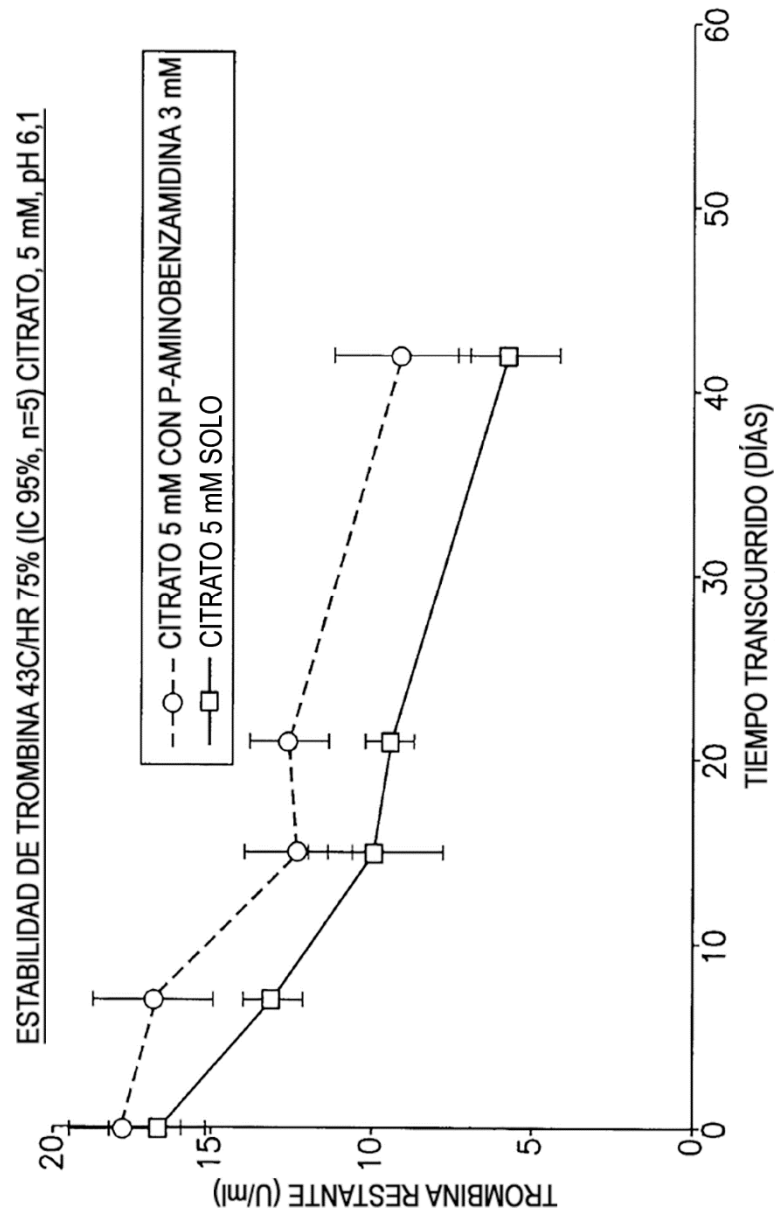


FIG.6

