

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 876**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2015 PCT/EP2015/079294**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16102196**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2015 E 15808179 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3237911**

54 Título: **Contenedor que comprende fracciones de hemoglobina**

30 Prioridad:

**22.12.2014 EP 14199807**

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

**09.03.2020**

73 Titular/es:

**EUROTROL B.V. (100.0%)  
Keplerlaan 20  
6716 BS Ede, NL**

72 Inventor/es:

**MAAS, BARTHOLOMEUS HENRICUS ANTONIUS  
y  
HUIZING, CAROLINA JOHANNA**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 746 876 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

Contenedor que comprende fracciones de hemoglobina

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos adyacentes, donde un primer compartimento comprende O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) líquida y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. La invención también se refiere a un kit para determinar la fiabilidad de un dispositivo de cooximetría, donde dicho kit comprende dicho contenedor y a un método para determinar la fiabilidad de un dispositivo de cooximetría usando dicho contenedor.

15 Antecedentes de la invención

[0002] La sangre es un medio complejo que contiene componentes celulares y no celulares. La proteína principal de los componentes celulares es la hemoglobina, que transporta oxígeno. El análisis de la sangre del paciente para determinar la cantidad total de hemoglobina (tHb) y las diferentes fracciones de hemoglobina es útil para un médico para evaluar el estado respiratorio del paciente. Algunos ejemplos de fracciones de hemoglobina son la hemoglobina oxigenadas (oxihemoglobina, O<sub>2</sub>Hb), la hemoglobina oxidada (metahemoglobina o hemiglobina, MetHb), la hemoglobina compleja con monóxido de carbono (carboxihemoglobina, cOHb) la hemoglobina reducida (deoxihemoglobina, HHb), la hemoglobina compleja con azufre (sulfohemoglobina, SHb) y la hemoglobina compleja con cianuro (cianometahemoglobina, CNMetb). En general, la O<sub>2</sub>Hb se oxida a lo largo del tiempo, convirtiéndose en MetHb. La MetHb no puede unirse al oxígeno, lo que es perjudicial para el sujeto en el que se ha formado la MetHb. Por ello, la mayoría organismos tiene enzimas tales como la MetHb reductasa, que convierte la MetHb de nuevo en O<sub>2</sub>Hb.

[0003] La "cooximetría," también denominada a veces CO-oximetría, se refiere generalmente al proceso, a menudo automatizado, en el que se utiliza una pluralidad de longitudes de onda para cuantificar varias fracciones de hemoglobina, en la misma muestra. El número de longitudes de onda requerido es igual a o superior al número de fracciones de hemoglobina de la muestra. Las longitudes de onda específicas empleadas dependen, al menos en parte, de las fracciones de hemoglobina por determinar, sus curvas de respuesta espectral y la calidad de los filtros o redes de difracción usados para aislar la luz con las longitudes de onda específicas seleccionadas.

[0004] Para asegurar resultados precisos, un cooxímetro requiere un programa de control de la calidad claramente definido. Dicho programa incluye generalmente el análisis de muestras con concentraciones conocidas de las varias fracciones de hemoglobina. Para estas muestras, en las que se requiere la presencia simultánea de MetHb y O<sub>2</sub>Hb en niveles concentración conocidos y fiables, es un problema que la O<sub>2</sub>Hb pueda oxidarse en MetHb. Esta oxidación no hace que la concentración de O<sub>2</sub>Hb ni la concentración de MetHb sean fiables o constantes. En tales muestras, el uso de MetHb reductasa para regenerar la O<sub>2</sub>Hb que se ha oxidado no es una solución a este problema, porque también disminuye sustancialmente la concentración deseada de MetHb. Es deseable un acceso a muestras de control de cooximetría buenas y fiables, que cuenten tanto con MetHb como con O<sub>2</sub>Hb.

[0005] La mayoría de controles de cooximetría se basan en colorantes (ver, por ejemplo, la patente EP 132 399). Este tipo de controles no son atractivos dado que sus características espectrofotométricas no son las mismas que las de las fracciones de hemoglobina en las muestras de sangre.

[0006] Otros controles cooximetría son controles a base de hemolizados (ver, por ejemplo, las patentes US 4 485 174, US 2003/0068822 o US 2012/0104323). Al usar estos controles, no es posible tener niveles diferentes constantes conocidos de O<sub>2</sub>Hb y MetHb en la misma muestra.

[0007] También se ha usado una preparación de hemoglobina bovina liofilizada con una mezcla de varias fracciones de O<sub>2</sub>Hb, COHb y MetHb como controles cooximetría. Se asume que esta preparación es espectrofotométricamente equivalente a una solución de hemoglobina bovina fresca (Maas et al, Clinical Chemistry, 44:11, 2331-2339 (1998)). Sin embargo, esta preparación requiere ser reconstituída antes de usarla y el proceso de liofilización y/o los aditivos usados para la liofilización pueden causar efectos de matriz.

[0008] Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de controles de cooximetría mejorados que no tengan los inconvenientes de la técnica anterior. Los controles de cooximetría de la invención son líquidos, listos para usar, y tienen niveles de O<sub>2</sub>Hb, COHb y MetHb diferentes, adaptados y fiables y no se prevé ningún o mínimo efecto de matriz cuando se usan los controles en diferentes analizadores de cooximetría.

65 Descripción de la invención

[0009] Los inventores descubrieron que, al almacenar las diferentes fracciones de hemoglobina por separado y mezclarlas antes de usarlas, en otras palabras, que al almacenar las fracciones de hemoglobina incompatibles por separado y mezclarlas antes de usarlas, es posible obtener un control de cooximetría líquido listo para usar con diferentes niveles de O<sub>2</sub>Hb, COHb y MetHb sin efectos de matriz o con efectos de matriz mínimos.

5

### Contenedor

[0010] En un primer aspecto, se proporciona un contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada.

10

[0011] Un contenedor puede ser cualquier recipiente adecuado para usar en un laboratorio siempre que esté dispuesto para comprender los dos compartimentos que retienen las fracciones de hemoglobina por separado. La invención establece que dichos compartimentos deberían ser adyacentes entre sí. De este modo, se proporciona un contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos adyacentes, donde un primer compartimento comprende O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende (metahemoglobina) MetHb, donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada.

15

[0012] De forma alternativa, las formas de realización de la presente invención se pueden implementar usando un ensamblaje de almacenamiento tal y como el que se describe en la publicación de patente internacional WO2014/142655, donde las fracciones de hemoglobina están almacenadas en la primera y segunda cámaras de almacenamiento separadas.

20

[0013] La expresión "fracción de hemoglobina" se puede sustituir por "especies de hemoglobina" o "forma de hemoglobina" o "porción de hemoglobina" o "derivado de la hemoglobina".

25

[0014] Una fracción de hemoglobina puede estar derivada de la hemoglobina presente en la sangre usando cualquier técnica conocida por el experto en la materia. En el contexto de la invención, la palabra "hemoglobina" se refiere a la cantidad total de hemoglobina (tHb), es decir todas fracciones de hemoglobina existentes.

30

[0015] "Una fracción de hemoglobina" puede referirse a o puede comprender o puede consistir en o puede estar derivada de al menos una de las siguientes fracciones de hemoglobina: una fracción de hemoglobina oxigenada (oxihemoglobina, O<sub>2</sub>Hb), una fracción de hemoglobina oxidada (metahemoglobina o hemoglobina, MetHb), una fracción de hemoglobina compleja con monóxido de carbono (carboxihemoglobina, COHb), una fracción de hemoglobina reducida (HHb), una fracción de hemoglobina compleja con azufre (sulfohemoglobina, SHb) y una fracción de hemoglobina compleja con cianuro (cianometahemoglobina, CNMetb).

35

[0016] La O<sub>2</sub>Hb es la fracción de hemoglobina donde el O<sub>2</sub> está unido a la molécula de hemoglobina. Dependiendo de las condiciones, el O<sub>2</sub> se podría liberar para formar HHb. Esta reacción es reversible. La MetHb es una fracción de hemoglobina en la que el O<sub>2</sub> no podría unirse debido a la oxidación de la molécula de hierro. La reducción del hierro en la MetHb conduce a la HHb o la O<sub>2</sub>Hb. La COHb es una fracción de hemoglobina en la que se une el CO en lugar del O<sub>2</sub>. Aunque la afinidad de la hemoglobina con el CO es de 200 a 250 veces la afinidad de hemoglobina con el oxígeno, la COHb se puede convertir en O<sub>2</sub>Hb o HHb.

45

[0017] A lo largo de toda la aplicación, la palabra "O<sub>2</sub>Hb" se puede sustituir por la expresión "una o la fracción de hemoglobina O<sub>2</sub>Hb" dependiendo del contexto. Ocurre lo mismo con otras fracciones de hemoglobina.

50

[0018] En el contexto de la invención, una fracción de hemoglobina O<sub>2</sub>Hb puede significar que al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la hemoglobina presente en una preparación está unida a O<sub>2</sub>.

55

[0019] En el contexto de la invención, una fracción de hemoglobina COHb puede significar que al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la hemoglobina presente en una preparación está unida a CO.

60

[0020] En el contexto de la invención, una fracción de hemoglobina MetHb puede significar que la molécula de hierro de al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la hemoglobina presente ha sido oxidada.

65

[0021] En una forma de realización preferida, una fracción de hemoglobina no comprende ninguna célula, más preferiblemente no comprende ningún glóbulo, todavía más preferiblemente no comprende ningún glóbulo blanco o rojo. En una forma de realización más preferida, una fracción de hemoglobina es una fracción sin células. Sin embargo, la invención no excluye que algunas células puedan estar presentes en una fracción de hemoglobina. No obstante, preferiblemente la fracción de hemoglobina O<sub>2</sub>Hb no comprende ninguna célula. En condiciones

fisiológicas, el porcentaje en volumen de glóbulos en sangre puede ser del 20 al 60 %. Por lo tanto, el porcentaje en volumen de células en una fracción de hemoglobina (O2Hb y/o MetHb) puede ser del 0 al 70 %.

[0022] Las fracciones referidas en la presente son preferiblemente fracciones sin células.

Como resultado de ello, los contenedores de varias formas de realización de la presente invención no derivan su capacidad de almacenar de forma estable fracciones de la separación física entre células y otras sustancias.

[0023] En una forma de realización preferida, un contenedor de la invención comprende O2Hb y MetHb como fracciones de hemoglobina, donde cada una de ellas está presente en un compartimento del contenedor.

#### Fracción de O2Hb

[0024] Una fracción de O2Hb se puede derivar de la hemoglobina presente en la sangre usando cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Preferiblemente, la sangre se trata con un anticoagulante y se centrifuga para eliminar el plasma y la capa leucocitaria (es decir, glóbulos blancos y plaquetas). Preferiblemente, la heparina se usa como un anticoagulante. Preferiblemente la centrifugación se lleva a cabo durante 15 minutos, a 3000 g. Se puede emplear cualquier otro método conocido por el experto en la materia para centrifugar la sangre.

[0025] Las células obtenidas después de la centrifugación y la eliminación del plasma y la capa leucocitaria comprenden los glóbulos rojos que comprenden la hemoglobina. Las células se pueden lavar. Preferiblemente las células se lavan dos veces. Más preferiblemente, las células se lavan con un 0,9 % de NaCl. Después del lavado, se puede añadir un tampón a dichas células para diluir la hemoglobina hasta obtener una concentración deseada. Preferiblemente, la concentración de hemoglobina es de 5 - 30 g/DL después de la dilución. En una forma de realización más preferida, la concentración de hemoglobina es de 10-25 g/DL después de la dilución, o de 20 - 30 g/DL después de la dilución. En una forma de realización más preferida, la concentración de hemoglobina es de 25 - 26 g/DL después de la dilución.

[0026] Un tampón de dilución preferido es uno de los tampones descritos por Norman E. Good, también conocido como tampones de Good (Norman E. Good et al, Hydrogen Ion buffers for biological research, Biochemistry, 1966, 5(2), pp. 467-477). Un tampón más preferido es 0,1 - 0,2 M de TAPSO ácido (3-[N-(trihidroximetil)metilamino]-2-hidroxipropanosulfónico) pH 8,0.

[0027] La O2Hb se obtiene preferiblemente a partir de los glóbulos precedentes de la siguiente manera: se añade preferiblemente 25 % (v/v) de tolueno a las células diluidas, la mezcla se puede agitar durante 10-120 minutos. Preferiblemente la mezcla se agita durante 30 - 100 minutos, más preferiblemente, la mezcla se agita durante 60 minutos. Después de la agitación, la mezcla se coloca en un embudo de decantación a 2-8 °C durante 12 - 24 horas. Preferiblemente, la mezcla se coloca a 2-8 °C durante 18 horas.

[0028] Preferiblemente, el hemolizado se separa y centrifuga durante 30 minutos a 2700 g, se filtra y centrifuga durante 90 minutos a 13000 g para eliminar los restos celulares y los estromas sobrantes.

[0029] El obtenido sobrenadante comprende la fracción de O2Hb. Este sobrenadante se puede diluir en un tampón adecuado. Preferiblemente, se usa uno de los tampones de Good. Más preferiblemente, el tampón tiene un pKa de 7,0 - 8,0, todavía más preferiblemente, el tampón es TAPSO, todavía más preferiblemente en una concentración final de 0,1 M, pH 7,4.

[0030] El sobrenadante (es decir, llamado hemolizado) se centrifuga posteriormente (preferiblemente 30 minutos en 2700 g) para eliminar cualquier precipitado. El segundo sobrenadante obtenido comprende la fracción de O2Hb en una forma todavía más purificada.

[0031] En una forma de realización preferida, se estabiliza la fracción de O2Hb. En la presente invención, se podría usar cualquier método para estabilizar la fracción de O2Hb conocido por el experto en la materia. Un experto en la materia aprecia que una fracción de O2Hb estabilizada se refiere a una fracción donde la fracción de O2Hb en la fracción Hb total sea constante con un equilibrio dinámico en un estado estable, y que, por tanto, la estabilización no implica la fijación de un estado oxigenado de compuestos de Hb individuales.

[0032] Algunos ejemplos de estabilización de O2Hb son la adición de estabilizadores de proteína o la adición de agentes quelantes metálicos tales como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

[0033] Una fracción de O2Hb se define como habiendo sido estabilizada cuando el porcentaje de hemoglobina unido al O<sub>2</sub> no cambia más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %.

[0034] En una forma de realización preferida, la fracción de O2Hb se estabiliza usando una MetHb reductasa. La MetHb reductasa se puede aislar de la membrana celular. También se puede usar una MetHb reductasa disponible comercialmente. La MetHb reductasa puede convertir la MetHb en O2Hb.

[0035] En una forma de realización más preferida, se agregan NAD y Na-lactato a la fracción de O2Hb junto con una MetHb reductasa. En el sistema de MetHb reductasa, el NADH (la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido) actúa como un donante de electrones al ion férrico en la metahemoglobina. Al agregar NAD (la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido) y lactato al sistema, se proporciona una fuente de cofactor NADH. El NAD actúa como un aceptor de protones, lo que lleva a la formación de NADH.

[0036] El NAD se agrega preferiblemente en una concentración de 0,5 - 1,0 mM, más preferiblemente en una concentración de 0,7 mM. El Na-lactato se agrega preferiblemente en una concentración de 0,02 - 0,1 M, más preferiblemente en una concentración de 0,06 M.

[0037] La solución de O2Hb se puede esterilizar. La esterilización se realiza preferiblemente usando filtros de 0,2 µM.

[0038] Resulta evidente para el experto en la materia que un contenedor según la invención podría prepararse comprendiendo cualquier concentración o cualquier cantidad de O2Hb en un compartimento de dicho contenedor. De forma alternativa, la O2Hb presente se expresa como el porcentaje de la cantidad total de hemoglobina presente en el contenedor de la invención. Algunos ejemplos de dicho posible porcentaje son: 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %.

[0039] 1 % de O2Hb significa que un 1 % de la cantidad total de hemoglobina presente en el contenedor de la invención es O2Hb. Si solo dos fracciones de hemoglobinas están presentes en el contenedor de la invención, esto significa, por lo tanto, que un 99 % de la cantidad total de hemoglobina está representada por MetHb. Ocurre lo mismo para cualquier otro porcentaje tal y como se ha indicado anteriormente.

#### Fracción de MetHb

[0040] Una fracción de MetHb puede derivarse de la hemoglobina presente en la sangre usando cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Preferiblemente, la sangre se trata con un anticoagulante y centrifuga para eliminar el plasma y la capa leucocitaria (es decir, glóbulos blancos y plaquetas). Preferiblemente, la heparina se usa como un anticoagulante. Preferiblemente, la centrifugación se lleva a cabo durante 15 minutos, a 3000 g. Se puede usar cualquier otro método conocido por una persona experta en la materia para centrifugar la sangre y eliminar el plasma.

[0041] Posteriormente, los leucocitos se eliminan mediante un filtro de leucocito y los glóbulos rojos se lisan agregando dos volúmenes de agua fría. Dicha filtración se lleva a cabo preferiblemente tal y como se describe en los ejemplos.

[0042] Posteriormente, se elimina el estroma mediante filtración de flujo tangencial y el hemolizado se concentra posteriormente hasta la concentración de hemoglobina deseada usando una filtración de flujo tangencial. En una forma de realización preferida, dicha filtración de flujo tangencial y posterior concentración se llevan a cabo tal y como se describe en los ejemplos.

[0043] La hemoglobina obtenida se convierte preferiblemente en MetHb mediante la adición de 0,5 - 1,5 mmol de NaNO2 por mmol de oxihemoglobina, más preferiblemente mediante la adición de 0,65 - 0,85 mmol de NaNO2 por mmol de oxihemoglobina.

[0044] Se puede emplear cualquier otro método conocido por un experto en la materia para convertir la hemoglobina en MetHb, algunos ejemplos son agregar azida o que dejar que el O2Hb se convierta naturalmente en MetHb.

[0045] La solución de MetHb se puede esterilizar y rellenar en un compartimento del contenedor. La esterilización se lleva a cabo preferiblemente usando filtros de 0,2 µm.

[0046] Resulta evidente para el experto en la materia que un contenedor según la invención podría prepararse comprendiendo cualquier concentración o cualquier cantidad de MetHb en un compartimento de dicho contenedor. De forma alternativa, la MetHb presente se expresa como el porcentaje de la cantidad total de hemoglobina presente en el contenedor de la invención. Algunos ejemplos de dicho posible porcentaje son: 0,1 %; 0,2 %; 0,3 %; 0,4 %; 0,5 %; 0,6 %; 0,7 %; 0,8 %; 0,9 %; 1 %; 2 %; 3 %; 4 %; 5 %; 6 %; 7 %; 8 %; 9 %; 10 %; 11 %; 12 %; 13 %; 14 %; 15 %; 16 %; 17 %; 18 %; 19 %; 20 %; 21 %; 22 %; 23 %; 24 %; 25 %; 26 %;

27 %; 28 %; 29 %; 30 %; 31 %; 32 %; 33 %; 34 %; 35 %; 36 %; 37 %; 38 %; 39 %; 40 %; 41 %; 42 %; 43 %; 44 %; 45 %; 46 %; 47 %; 48 %; 49 %; 50 %; 51 %; 52 %; 53 %; 54 %; 55 %; 56 %; 57 %; 58 %; 59 %; 60 %; 61 %; 62 %; 63 %; 64 %; 65 %; 66 %; 67 %; 68 %; 69 %; 70 %; 71 %; 72 %; 73 %; 74 %; 75 %; 76 %; 77 %; 78 %; 79 %; 80 %; 81 %; 82 %; 83 %; 84 %; 85 %; 86 %; 87 %; 88 %; 89 %; 89 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 %; 99,1 %; 99,2 %; 99,3 %; 99,4 %; 99,5 %; 99,6 %; 99,7 %; 99,8 %; 99,9 %.

[0047] 1% de MetHb significa que un 1 % de la cantidad total de hemoglobina presente en el contenedor de la invención es MetHb. Si solo dos fracciones de hemoglobinas están presentes en el contenedor de la invención, este significa, por lo tanto, que el 99 % de la cantidad total de hemoglobina está representado por la O2Hb. Ocurre lo mismo para cualquier otro porcentaje tal y como se ha indicado anteriormente.

[0048] Un contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 10 % de O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 90 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

[0049] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 20 % de O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 80 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

[0050] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 30 % de O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 70 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

[0051] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 40 % de O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 60 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

[0052] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 50 % de O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 50 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

[0053] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 60 % de O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 40 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

[0054] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 70 % de O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 30 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

[0055] Otro contenedor preferido de la invención donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 80 % de O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 20 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

[0056] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 90 % de O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 10 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

[0057] En otra forma de realización preferida de la invención, el contenedor comprende otra fracción de hemoglobina. Esta "otra" o "adicional" fracción de hemoglobina puede comprender COHb (carboxihemoglobina) y/o otras fracciones como SHb o CNMetb y puede estar presente en el primer y/o segundo compartimentos del contenedor de la invención. Una fracción de COHb y/o otras fracciones como SHb o CNMetb pueden estar presentes en el primer o en el segundo compartimentos del contenedor. Esto significa que la fracción de COHb y/o otras fracciones como SHb o CNMetb pueden estén junto con la fracción de O2Hb. También es posible que la fracción de COHb y/o otras fracciones como SHb o CNMetb estén junto con la fracción de MetHb. Ocurre lo mismo para la HHb.

[0058] Una fracción de COHb podría prepararse usando cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Preferiblemente, una fracción de COHb se obtiene convirtiendo una fracción de O2Hb en una fracción de COHb mediante la adición de monóxido de carbono.

[0059] Resulta evidente para el experto en la materia que un contenedor según la invención podría prepararse comprendiendo cualquier concentración o cantidad de COHb en un compartimento de dicho contenedor. De forma alternativa, la COHb presente se expresa como el porcentaje de la cantidad total de hemoglobina presente en el contenedor de la invención. Algunos ejemplos de dicho posible porcentaje son: 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %.

32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %.

[0060] Una fracción de HHb podría prepararse usando cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Un ejemplo de dicha técnica es la adición de reactivo de Stokes amoniado (FeSO<sub>4</sub> y ácido tartárico) a la O<sub>2</sub>Hb.

[0061] Resulta evidente para el experto en la materia que un contenedor según la invención podría prepararse comprendiendo cualquier concentración o cantidad de HHb en un compartimento de dicho contenedor. De forma alternativa, la HHb presente se expresa como el porcentaje de la cantidad total de hemoglobina presente en el contenedor de la invención. Algunos ejemplos de dicho posible porcentaje son: 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %.

[0062] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 90 % de O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 5 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. En esta forma de realización preferida, está presente un 5 % de COHb en el primer o en el segundo compartimento del contenedor.

[0063] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 80 % de O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 10 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. En esta forma de realización preferida, está presente un 10 % de COHb en el primer o en el segundo compartimento del contenedor.

[0064] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 70 % de O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 15 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. En esta forma de realización preferida, está presente un 15 % de COHb en el primer o en el segundo compartimento del contenedor.

[0065] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 60 % de O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 20 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. En esta forma de realización preferida, está presente un 20 % de COHb o en el primer o en el segundo compartimento del contenedor.

[0066] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 50 % de O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 25% de MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. En esta forma de realización preferida, está presente un 25 % de COHb en el primer o en el segundo compartimento del contenedor.

[0067] Otro contenedor preferido de la invención es un contenedor que comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende 40 % de O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende 30 % de MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. En esta forma de realización preferida, está presente un 30 % de COHb o en el primer o en el segundo compartimento del contenedor.

[0068] Cada una de las fracciones de hemoglobina referidas en la presente se deriva de sangre. Preferiblemente, la sangre procede de un animal mamífero. Más preferiblemente, la sangre de mamífero es sangre bovina o sangre humana. Como es conocido por el experto en la materia, la fuente de fracciones de hemoglobina puede tener un impacto en la composición de dicha fracción de hemoglobina. Este es, por ejemplo, el caso con la presencia de sustancias de traza en las fracciones. Por ejemplo, sustancias que están presentes en la sangre humana pero no en la sangre bovina pueden estar presentes en una fracción de hemoglobina derivada de la sangre humana, quizás como una sustancia de traza, pero no en una fracción de hemoglobina derivada de la sangre bovina, ni siquiera como una sustancia de traza. De ello se deduce que la fuente de la sangre de la que se derivan las fracciones de hemoglobina pueden, por lo tanto, tener un efecto en las fracciones de hemoglobina

mismas. Dado que las fracciones de hemoglobina están comprendidas en el contenedor de la invención, por lo tanto, la fuente de las fracciones de hemoglobina afecta también al contenido del contenedor de la invención. El contenedor de la invención no es un contenedor vacío.

5 [0069] Resulta evidente para el experto en la materia que la concentración total de hemoglobina no está limitada a una concentración. Algunos ejemplos de concentraciones posibles incluyen: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 g/DL.

10 [0070] También resulta evidente para el experto en la materia que el contenedor de la invención también puede comprender un analito. Dicho analito es preferiblemente un analito que es pertinente en bioquímica clínica, y que no es O<sub>2</sub>Hb, MetHb o COHb. La presencia y preferiblemente la cantidad de dicho analito puede, por ejemplo, evaluarse mediante espectrofotometría. Por ejemplo, un contenedor puede comprender bilirrubina y/o glucosa, u otros analitos que son pertinentes en bioquímica clínica. Los analitos preferidos son los analitos que se pueden evaluar mediante espectrofotometría. En este contexto, la evaluación de un analito puede significar la detección de la presencia de un analito, o la determinación de la concentración con la cual dicho analito está presente. Dicho analito puede estar presente en un compartimento con O<sub>2</sub>Hb y/o en un compartimento con MetHb. De forma alternativa, un analito puede estar presente con O<sub>2</sub>Hb y otro analito puede estar presente con MetHb. Una forma de realización preferida es, por lo tanto, un contenedor tal y como se ha descrito aquí previamente, donde un analito adicional está presente en un compartimento de dicho contenedor. Una forma de realización más preferida es un contenedor tal y como se ha descrito anteriormente, donde dicho analito adicional es un analito que se puede evaluar mediante espectrofotometría. Una forma de realización aún más preferida es un contenedor tal y como se ha descrito anteriormente, donde dicho analito adicional es bilirrubina o glucosa, más preferiblemente bilirrubina.

25 [0071] La presente invención en otra forma de realización proporciona un contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende (metahemoglobina) de MetHb, donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada, donde los al menos dos compartimentos forman parte de un ensamblaje dispuesto para almacenar por separado las fracciones de hemoglobina. En una forma de realización preferida, dichos compartimentos son compartimentos adyacentes.

30 [0072] Una forma de realización más preferida es un contenedor donde los al menos dos compartimentos forman parte de un ensamblaje dispuesto para almacenar por separado las fracciones de hemoglobina, donde el ensamblaje comprende además una disposición de mezclado que proporciona un canal de comunicación entre los al menos dos compartimentos para mezclar las fracciones de hemoglobina directamente antes del uso. Una forma de realización más preferida adicional es un contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos que pueden ser adyacentes entre sí, donde un primer compartimento comprende O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada, donde los al menos dos compartimentos forman parte de un ensamblaje dispuesto para almacenar por separado las fracciones de hemoglobina, donde el ensamblaje comprende además una disposición de mezclado que proporciona un canal de comunicación entre los al menos dos compartimentos para mezclar las fracciones de hemoglobina directamente antes del uso.

45 [0073] La presente invención, en otra forma de realización, proporciona un contenedor donde los al menos dos compartimentos presentan un canal de comunicación entre ellos. Como tal, la invención proporciona un contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos, donde comprende además un canal de comunicación entre los al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. En una forma de realización preferida, dichos al menos dos compartimentos son compartimentos adyacentes.

50 [0074] La configuración de al menos dos compartimentos y la disposición de mezcla puede ser de tal manera que permite la introducción de una dosis de O<sub>2</sub>Hb de un compartimento, en un segundo compartimento que contiene la MetHb, o la introducción de una dosis de MetHb de un compartimento, en un segundo compartimento que contiene la O<sub>2</sub>Hb.

55 [0075] Dicho ensamblaje puede ser una forma de realización tal y como se describe en la publicación de patente internacional WO2007/040396. El ensamblaje comprende una parte de dosificación y una parte de suministro, donde la parte de dosificación está dispuesta para recibir una dosis de la sustancia de mezclado (por ejemplo que contiene una de las fracciones de hemoglobina O<sub>2</sub>Hb o MetHb) y donde dicha parte de suministro comprende una salida para introducir la dosis en el contenedor (que ya contiene la otra de las fracciones de hemoglobina: MetHb u O<sub>2</sub>Hb respectivamente). La parte de dosificación y la parte de suministro se pueden configurar para que cooperen la una con la otra, de manera que una cámara de presión con un volumen cambiante se forme adyacente a la salida cuando la parte de suministro y la parte de dosificación están unidas, donde dicha cámara de presión funciona para habilitar una acción de bombeo para bombear la dosis dentro y



fuera del contenedor (y, por tanto, mezclar las fracciones de hemoglobina de O2Hb y MetHb). En otra forma de realización, la parte de dosificación anteriormente mencionada y la parte de suministro son adyacentes entre sí.

5 [0076] En formas de realización preferidas, el contenedor que comprende al menos dos compartimentos forma una unidad. En dichas formas de realización preferidas, el contenedor que comprende al menos dos compartimentos forma un ensamblaje. Como tal, siempre que este documento se refiera a un contenedor, se podría leer como un ensamblaje de contenedor. Un ensamblaje de contenedor preferido es un ensamblaje de contenedor que consiste esencialmente en los al menos dos compartimentos, donde un primer compartimento comprende O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada, opcionalmente donde dichos compartimentos son compartimentos adyacentes. En 10 una forma de realización más preferida, un contenedor de la invención consiste esencialmente en al menos dos compartimentos, dispuestos para almacenar por separado las fracciones de hemoglobina, donde el ensamblaje comprende además una disposición de mezclado que proporciona un canal de comunicación entre los al menos dos compartimentos para mezclar las fracciones de hemoglobina directamente antes del uso.

15 [0077] Una forma de realización preferida adicional de la invención es un ensamblaje de contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho ensamblaje de contenedor comprende al menos dos compartimentos ensamblados, donde un primer compartimento comprende O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada. Una forma de 20 realización más preferida es un ensamblaje de contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho ensamblaje de contenedor comprende al menos dos compartimentos ensamblados que se pueden poner en comunicación de fluido entre sí, donde un primer compartimento comprende O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada. Una forma de realización aún más preferida es un ensamblaje de contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho ensamblaje de contenedor comprende al menos dos compartimentos ensamblados que se pueden 25 poner en comunicación de fluido entre sí, donde un primer compartimento comprende O2Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O2Hb está estabilizada.

30 [0078] De forma alternativa, el contenedor según la presente invención se puede llevar a cabo como un ensamblaje de almacenamiento según una de las formas de realización descritas en la publicación de patente internacional WO2014/142655. Dicho ensamblaje de almacenamiento para dos sustancias que se van a mezclar (es decir, O2Hb y MetHb) antes del uso se muestra esquemáticamente en la fig. 1 y en la forma de realización mostrada comprende una punta cuentagotas cerrable 3. Una primera cámara de almacenamiento 7 (que contiene una de las fracciones de hemoglobina, O2Hb o MetHb) se forma por la punta cuentagotas cerrable 3 y 35 una primera parte de contenedor 2, 4, donde la primera parte de contenedor 2, 4 está provista de al menos una abertura 43. Una segunda cámara de almacenamiento 8 (que contiene la otra fracción de hemoglobina, MetHb u O2Hb respectivamente) se forma por una segunda parte de contenedor 5 que comprende una parte de extremo abierta 52, 53 que cierra la al menos una abertura 43 en una primera posición operativa. La primera y la segunda parte de contenedor 2, 4; 5, 6 se pueden mover la una con respecto a la otra, y están en comunicación de fluido a través de la al menos una abertura 43 en una segunda posición de funcionamiento donde el área de superficie de flujo total de la al menos una abertura 43 es al menos igual a un área transversal de la primera parte de 40 contenedor 2, 4. La fig. 1 muestra una vista en corte transversal de una forma de realización del ensamblaje de almacenamiento según la presente invención.

45 [0079] La fig. 1 muestra una vista en corte transversal de una forma de realización de un ensamblaje de almacenamiento 1 según la presente invención, que comprende una punta cuentagotas cerrable 3 y una primera cámara de almacenamiento 7 formada por una primera parte de contenedor 2, 4 y la punta cuentagotas cerrable 3. La punta cuentagotas cerrable 3 está conectada de manera estanca a un recipiente 2 de la primera parte de contenedor 2, 4, usando por ejemplo un borde 22 cerca de un primer extremo 21 del recipiente 2 acoplado a una 50 superficie interna de un cuerpo de punta cuentagotas 12.

[0080] En la forma de realización mostrada, la primera parte de contenedor 2,4 comprende además una parte tubular 4, acoplada de forma estanca a un segundo extremo 23 del recipiente 2, usando un primer extremo 41 de la parte tubular 4 de la que el diámetro exterior coincide con el diámetro interno del segundo extremo 23 del 55 recipiente 2. El acoplamiento se puede mejorar adicionalmente usando, por ejemplo, las partes de cierre a presión 47 mostradas en la fig. 1, que se dimensionan para acoplarse a un borde dispuesto en el segundo extremo 23.

60 [0081] La parte tubular 4 dispone de al menos una abertura 43 que se extiende sobre una parte de la circunferencia de la parte tubular 4 cerca de una superficie de extremo interna 42 de la misma. Estas aberturas 43 están cerradas en la primera posición de funcionamiento del ensamblaje, tal y como se muestra en la fig. 1 por una parte de extremo abierta 53 que forma parte de una segunda parte de contenedor 5. Por ejemplo, tal y como se muestra en la forma de realización de la fig.1, el diámetro interno de la parte de extremo abierta 53 se hace coincidir para proporcionar un acoplamiento estanco a un diámetro de exterior del extremo de la parte 65 tubular 4.

[0082] De este modo, la primera cámara de almacenamiento 7 se forma por las superficies internas del recipiente 2, la punta cuentagotas cerrable 3, la parte tubular 4, y la parte de extremo abierta 53.

[0083] Una segunda cámara de almacenamiento 8 se forma por las superficies internas de la segunda parte de contenedor 5 y la superficie externa del segundo extremo 42 de la parte tubular 4. En la forma de realización mostrada, la segunda parte de contenedor 5 comprende una tapa de cierre opcional 6. La segunda parte de contenedor 5 puede estar provista de uno o más elementos de cierre a presión 54 que bloquean aberturas de pestillo correspondientes 64 de la tapa de cierre 6. En una forma de realización alternativa, la segunda parte de contenedor 5 se proporciona como una pieza única.

[0084] La primera parte de contenedor 2, 4 y la segunda parte de contenedor 5 son móviles la una con respecto a la otra. En la forma de realización específica mostrada, esto se hace posible por la parte tubular 4 que incluye una superficie interna 4a que coincide con una superficie externa de la segunda parte de contenedor 5.

[0085] Cuando se produce un desplazamiento a la segunda posición de funcionamiento del ensamblaje de almacenamiento, la primera cámara 7 y la segunda cámara 8 se ponen en comunicación de fluido entre sí a través de la al menos una abertura 43, proporcionando así una forma muy fácil y conveniente de activar el producto permitiendo que las dos sustancias se mezclen. La al menos una abertura 43 se abrirá sobre casi toda su longitud L1 (ver fig. 1), como resultado de lo cual el área de superficie de flujo total de la al menos una abertura 43 es al menos igual a una área transversal de la primera parte de contenedor 2, 4. Como resultado de ello, después de la activación del ensamblaje de almacenamiento 1, no se produce ninguna resistencia de flujo, lo que permite un mezclado muy suave, sin movimientos violentos de las sustancias que se van a mezclar. Especialmente cuando se necesita mezclar ciertos tipos de sustancias en las que solo se permite un bajo cizallamiento, tal como en el caso de sustancias que comprenden proteína, albúmina, células de sangre total o sustancias que comprenden un tensioactivo, solo se permite un mezclado muy suave. De ello se deduce que una forma de realización preferida de la invención es un contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos que se pueden poner en comunicación de fluido entre sí, donde un primer compartimento comprende O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. Una forma de realización más preferida es un contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos adyacentes que se pueden poner en comunicación de fluido entre sí, donde un primer compartimento comprende O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende MetHb (metahemoglobina), donde la O<sub>2</sub>Hb está estabilizada. En las formas de realización preferidas, se consigue una comunicación fluida a través de la operación destinada del contenedor solo, por ejemplo tal y como se ha descrito anteriormente, sin la necesidad de elementos externos tales como pipetas o robots de muestreo. Como tal, en esta aplicación, siempre que al menos dos compartimentos se mencionen como capaces de ser puestos en comunicación de fluido entre sí, debe interpretarse que dichos al menos dos compartimentos forman parte de un ensamblaje que está dispuesto para poner dichos al menos dos compartimentos en comunicación de fluido entre sí.

[0086] En otra forma de realización, la primera cámara de almacenamiento 7 comprende O<sub>2</sub>Hb y la segunda cámara de almacenamiento 8 comprende MetHb.

[0087] De forma alternativa, en otra forma de realización, la segunda cámara de almacenamiento 8 comprende O<sub>2</sub>Hb y la primera cámara de almacenamiento 7 comprende MetHb.

[0088] Las siguientes son formas de realización adicionales o consideraciones acerca del contenedor de la invención:

Son conocidos los objetos que comprenden múltiples componentes y, aún así, forman una unidad, tales como el ensamblaje de contenedor o el contenedor tal y como se ha descrito anteriormente. Algunos ejemplos son una bicicleta o una botella de vino con corcho. Dado que las formas de realización preferidas de la invención forman una unidad, se deduce que en las formas de realización preferidas de la invención, el contenedor no es un frigorífico que contiene contenedores adicionales que contienen cada uno fracciones de hemoglobina. De forma similar, en las formas de realización preferidas, el contenedor no es una caja ni cualquier de otro medio de almacenamiento que contiene o presenta contenedores individuales que comprenden fracciones de hemoglobina. En las formas de realización preferidas, los compartimentos del contenedor o del ensamblaje de contenedor están en un acoplamiento de contacto que proporciona una conexión mecánica. Un ejemplo no limitativo de este tipo de acoplamiento de contacto que proporciona una conexión mecánica es un clavo en un tablero. En las formas de realización preferidas de la invención, el contenedor no se desmonta en sus compartimentos separados simplemente cuando se posiciona bajo un ángulo determinado, o de una forma determinada. En las formas de realización preferidas, el contenedor o los compartimentos no están hechos de una o pieza de un material sólida o continua. En las formas de realización preferidas, los compartimentos comprendidos en el contenedor no están organizados como en una matriz o como en una rejilla.

[0089] Los contenedores de la invención permiten proporcionar estándares fiables para la cooximetría, es decir, proporcionar controles de cooximetría fiables, que muestran concentraciones conocidas y estables de fracciones

de Hb. Los controles no tienen los inconvenientes de los descritos en la técnica anterior. Los controles de cooximetría proporcionados por los contenedores de la invención son líquidos, listos para usar, tienen niveles diferentes de O<sub>2</sub>Hb, COHb y MetHb reales, no contienen colorantes artificiales, y no se prevé ningún efecto de matriz o efectos mínimos cuando se usan los controles en diferentes analizadores de cooximetría.

5

Kit

[0090] En otro aspecto, se proporciona un kit para determinar la fiabilidad de un dispositivo de cooximetría, el kit comprende (i) al menos un contenedor tal y como se define en el primer aspecto, y (ii) instrucciones para mezclar las fracciones de hemoglobina contenidas en el contenedor con el objetivo de obtener una o más muestras de control, y para medir la concentración de una fracción de hemoglobina presente usando dicho dispositivo. Este kit comprende los controles de cooximetría de la invención.

10

[0091] Preferiblemente, el kit está listo para usar una vez que las fracciones de hemoglobina se han mezclado entre ellas. El contenedor de la invención que comprende controles de cooximetría es bastante atractivo en comparación con los controles de cooximetría existentes ya que el contenedor está listo para usar y se podría almacenar durante más de 1, 2, 3, 4 semanas o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más sin que se produzcan cambios en cualquier cantidad sustancial de cualquiera de las fracciones de hemoglobina. Una vez que las fracciones de hemoglobina se han mezclado entre ellas, los controles de cooximetría ser podrían usar en 1, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 minutos o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 horas o más sin que se produzcan cambios en cualquier cantidad sustancial de las fracciones de hemoglobina. "Sin que se produzcan cambios en cualquier cantidad sustancial" significa preferiblemente un cambio inferior al 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos de la cantidad inicial u original de las fracciones de hemoglobina. Un cambio puede ser una disminución o un aumento de la cantidad de una fracción de hemoglobina.

15

20

25

#### Método

[0092] En un aspecto adicional, se proporciona un método para determinar la fiabilidad de un dispositivo de cooximetría, que comprende las siguientes etapas sucesivas:

30

- a) mezclar fracciones de hemoglobina presentes en un contenedor tal y como se ha definido aquí con el objetivo de obtener una muestra de control con concentraciones definidas de fracciones de hemoglobina;
- b) medir, mediante el dispositivo, la concentración de una fracción de hemoglobina presente en la muestra de control de la etapa a);
- c) determinar la fiabilidad del dispositivo sobre la base de la diferencia entre (i) las concentraciones conocidas de las fracciones de hemoglobina de la muestra obtenida al final de la etapa a) y (ii) el resultado de la medición de la medición de la etapa b).

35

40

#### General

[0093] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usa en su sentido no limitativo para designar que los elementos que siguen a dicha palabra están incluidos, pero los elementos que no se hayan mencionado específicamente no están excluidos. Asimismo, el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en", lo que significa que un contenedor, un kit o un método tal y como se ha definido en la presente puede comprender componente(s) adicional(es), respectivamente una o más partes, respectivamente una o más etapas que las que se han identificado específicamente, donde dicho(s) componente(s) adicional(es), respectivamente una o más partes, respectivamente una o más etapas no alteran la característica única de la invención.

45

50

[0094] Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno" no excluye la posibilidad de que más de uno de dicho elemento estén presentes, a menos que el contexto requiera claramente que únicamente haya uno de los elementos. Por lo tanto, el artículo indefinido "un" o "uno" significa generalmente "al menos uno".

55

[0095] Cada uno de los valores numéricos "x" descritos en la descripción especialmente en el contexto de una temperatura, tiempo, velocidad, concentración en un método para preparar una fracción de hemoglobina no se limita al valor exacto "x" descrito. La aplicación engloba el valor "x" más o menos 1 % de dicho valor.

60

[0096] En este documento, cuando se describen compartimentos como adyacentes, también debe interpretarse que dichos compartimentos son adyacentes. Un experto en la materia sabrá lo que son compartimentos adyacentes / contiguos. La mayoría de las veces, los compartimentos adyacentes / contiguos están conectados mecánicamente el uno al otro. Algunos ejemplos no limitativos de conexiones mecánicas son que los compartimentos adyacentes comparten una pared de subdivisión y no se pueden separar, o que los compartimentos adyacentes se encuentran en un acoplamiento de contacto entre sí, o que los compartimentos

65

adyacentes están en un acoplamiento de contacto con una estructura de acoplamiento que, de este modo, está en acoplamiento de contacto con ambos compartimentos adyacentes, conectando mecánicamente los compartimentos adyacentes. Los compartimentos adyacentes pueden compartir una superficie de subdivisión, o pueden ser independientes pero estar muy cerca el uno del otro, preferiblemente no más lejos de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 mm. Preferiblemente, no hay otro elemento entre los elementos adyacentes. Los ejemplos siguientes se ofrecen únicamente con objetivos ilustrativos, y no se destinan a limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

### Ejemplos

[0097] Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

#### Ejemplo 1: preparación de oxihemoglobina

[0098] Se extrajo sangre de vacas usando heparina como un anticoagulante y se centrifugó (15 minutos, 3000 g) para eliminar el plasma y la capa leucocitaria.

[0099] Los glóbulos rojos se lavaron dos veces con 0,9 % de NaCl y se añadió 0,1 M de TAPSO ácido (3-[N-(tris-hidroximetil)metilamino]-2-hidroxiopropanosulfónico) pH 8,0 para diluir hasta obtener la concentración de hemoglobina deseada.

[0100] Se añadió un 25 % (v/v) de tolueno, la mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente y se colocó en un embudo de decantación a 2-8 °C durante 18 horas.

[0101] El hemolizado se separó y centrifugó durante 30 minutos a 2700 g, se filtró sobre un filtro de papel y centrifugó durante 90 minutos a 13000 g.

[0102] Se añadió TAPSO hasta obtener una concentración final de 0,1 M pH 7,4.

[0103] Se añadieron 0,7 mM de NAD (la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido) y 0,06 M de Na-lactato para proporcionar una fuente de cofactor NADH al sistema de MetHb reductasa.

[0104] El hemolizado se centrifugó (30 minutos a 2700 g) para eliminar cualquier precipitado.

[0105] El hemolizado se esterilizó utilizando filtros de 0,2 µm (AcroPak 200, obtenido de VWR International B.V., Países Bajos).

[0106] El hemolizado resultante consiste en un 90-100 % oxihemoglobina.

#### Ejemplo 2: preparación de metahemoglobina

[0107] Se extrajo sangre de vacas usando heparina como un anticoagulante y se centrifugó (15 minutos, 3000 g) para eliminar el plasma y la capa leucocitaria.

[0108] Los leucocitos se eliminaron mediante un filtro de disminución de leucocitos (BioR, obtenido de fresenius HemoCare, Países Bajos) y los glóbulos rojos se lisaron añadiendo dos volúmenes de agua fría.

[0109] El estroma se eliminó mediante filtración de flujo tangencial usando un filtro HVMP de 0,45 µm (obtenido de Merck Chemicals B.V./Milipore, Países Bajos) y el hemolizado se concentró hasta obtener la concentración de hemoglobina deseada mediante filtración de flujo tangencial usando un filtro Delta T-centracette de 10 kDa (obtenida de Pall, Países Bajos).

[0110] La hemoglobina se convirtió en metahemoglobina añadiendo 0,75 mmol de NaNO<sub>2</sub> por mmol de oxihemoglobina.

[0111] La solución de metahemoglobina 100 % se esterilizó usando filtros de 0,2 µm (AcroPak200).

#### Ejemplo 3: preparación de carboxihemoglobina

[0112] El monóxido de carbono se llevó a través del hemolizado preparado según el ejemplo 1 o el ejemplo 2 para convertir la hemoglobina en carboxihemoglobina.

[0113] La carboxihemoglobina se esterilizó usando filtros de 0,2 µm (AcroPak200).

**Ejemplo 4: preparación del control CO-OX líquido**

[0114] La oxihemoglobina, preparada según el ejemplo 1, se rellenó en un compartimento de un contenedor tal y como se representa en la figura 1 (1 mL de oxihemoglobina por contenedor).

5 [0115] La metahemoglobina, preparado según el ejemplo 2, se rellenó en el otro compartimento de un contenedor tal y como se representa en la figura 1 (1 mL de metahemoglobina por contenedor).

[0116] Antes del relleno, la carboxihemoglobina, preparada según el ejemplo 3, se mezcló con la oxihemoglobina o la metahemoglobina.

10 [0117] Al variar la concentración de la hemoglobina total y mezclar diferentes cantidades de carboxihemoglobina con oxihemoglobina y/o metahemoglobina, se hicieron 6 niveles con concentraciones diferentes de hemoglobina total y diferentes fracciones de oxihemoglobina, metahemoglobina y carboxihemoglobina.

15 [0118] Los controles de CO-OX líquidos se almacenaron a 2-8 °C.

**Ejemplo 5**

20 [0119] Después de la mezcla de ambos compartimentos del contenedor, los controles fueron analizados en un cooxímetro (ABL800) con los resultados siguientes:

**Tabla 1: control de CO-OX líquido de Eurotrol**

Control de Eurotrol	tHb g/DL	O <sub>2</sub> Hb %	COHb %	MetHb %
Nivel 1	18,0	93,7	6,3	2,1
Nivel 2	10,3	82,1	11,1	8,8
Nivel 3	12,3	72,6	15,2	14,0
Nivel 4	13,2	57,3	21,5	22,5
Nivel 5	14,7	51,9	25,9	23,5
Nivel 6	17,2	40,7	29,2	31,0

25 [0120] Para la comparación, se midió un control de CO-OX existente (QC 253 Full Range CO-Oximeter Control de RNA Medical).

**Tabla 2: controles de CO-OX existentes**

RNA QC 253 Full Range CO-Oximeter Control				
Control de RNA	tHb g/DL	O <sub>2</sub> Hb %	COHb %	MetHb %
Nivel 1	8,1	96,6	2,5	0,3
Nivel 2	13,9	83,5	15,3	0,2
Nivel 3	17,5	55,4	43,2	0,3

30 Conclusión:

[0121] Una comparación del control de CO-OX líquido de Eurotrol con el control QC 253 Full Range CO-Oximeter Control de RNA muestra la ventaja del control de CO-OX líquido de Eurotrol: cada nivel del control de CO-OX líquido de Eurotrol consiste en porcentajes diferentes de O<sub>2</sub>Hb, COHb y MetHb, y cada fracción de Hb diferente puede estar presente en concentraciones en rangos altos, rangos bajos o rangos medios. Por ejemplo, la MetHb puede estar presente en concentraciones que varían de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 30 %, y la O<sub>2</sub>Hb puede estar presente en concentraciones que varían de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 40 %. En cambio, los valores de la tabla 2 muestran que únicamente las concentraciones de O<sub>2</sub>Hb y COHb son sustanciales, y que únicamente dichas concentraciones muestran realmente una variación absoluta significativa.

[0122] Cada nivel del control QC 253 Full Range CO-Oximeter Control de RNA consiste en porcentajes diferentes de O<sub>2</sub>Hb y COHb pero el porcentaje de MetHb es el mismo (y muy bajo) para todos los niveles.

45

**Ejemplo 6: estabilidad del control de CO-OX líquido**

[0123] El hemolizado se produjo según el ejemplo 1 y se colocó a 2-8 °C. A modo de un control, se produjo un hemolizado sin un sistema de metahemoglobina reductasa presente y se colocó a 2-8 °C. En determinados puntos temporales, se midieron ambas muestras en un cooxímetro (ABL800) con los resultados siguientes:

5

**Tabla 3: hemolizado sin metahemoglobina reductasa**

# días a 2-8 °C	O2Hb, %	MetHb, %
0	94,4	6,9
11	92,5	9,3
28	89,6	12,1

**Tabla 4: hemolizado estabilizado**

# días a 2-8 °C	O2Hb, %	MetHb, %
0	95,4	2,2
12	95,0	2,2
26	95,4	2,3
139	95,1	2,6

10

[0124] Para el hemolizado estabilizado, tanto la fracción de oxihemoglobina como la fracción de metahemoglobina son estables. En el hemolizado no tratado, la oxihemoglobina se oxida en metahemoglobina, de modo que ambas fracciones varían con el tiempo. La oxidación en metahemoglobina ya comienza durante el proceso de producción.

**Ejemplo 7: fiabilidad de los controles de CO-OX líquidos**

15

[0125] Se prepararon un número de controles líquidos según el ejemplo 4 con una tHb de aproximadamente 13,5 g/DL, una fracción de O2Hb de aproximadamente el 61 %, una fracción de COHb de aproximadamente el 20 %, y una fracción de MetHb de aproximadamente 18,5 %. Los contenedores se distribuyeron en un gran número de laboratorios, donde se instalaron varios tipos de cooxímetros. Los controles líquidos se midieron y los resultados se muestran en la tabla 5.

20

**Tabla 5: fiabilidad a través de los laboratorios y dispositivos**

Grupo de comparación	tHb		O2Hb		COHb		MetHb	
	Laboratorios	Media (SD)	Laboratorios	Media (SD)	Laboratorios	Media (SD)	Laboratorios	Media (SD)
AVOXimeter 1000, 4000	116	13,54 (0,47)	124	60,22 (1,12)	87	19,77 (1,28)	63	17,52 (0,76)
IL GEM OPL	33	13,42 (0,36)	38	61,01 (0,71)	52	19,69 (1,11)	35	17,55 (0,63)
IL Gem Premier 4000	68	12,35 (0,24)	70	62,23 (0,7)	77	20,61 (0,4)	65	18,11 (0,69)
Cooxímetro ABL 80 de Radiometer	73	13,28 (0,31)	71	62,29 (0,65)	93	18,79 (0,45)	66	20,02 (0,47)
Serie ABL 800 de Radiometer	52	13,43 (0,13)	51	61,05 (0,73)	62	19,35 (0,32)	53	20,68 (0,35)
ABL 90 de Radiometer	11	13,93 (0,41)	13	62,75 (0,46)	16	18,89 (0,25)	13	19,96 (0,52)
Cobas b 221 de Roche	29	12,87 (0,08)	25	61,26 (0,39)	38	19,84 (0,2)	31	18,47 (0,33)
1265 de Siemens	14	14,21 (0,27)	11	61,15 (1,57)	15	20,52 (0,3)	12	17,98 (1,55)
1245, 1265 de Siemens	16	14,23 (0,26)	13	61,24 (1,45)	17	20,53 (0,28)	14	17,93 (1,49)
RapidPoint 405 de Siemens	66	14,44 (0,17)	65	61,96 (0,44)	75	20,22 (0,26)	62	17,57 (0,3)
RapidPoint 500 de Siemens	39	14,55 (0,16)	41	61,71 (0,58)	47	20,36 (0,25)	39	17,73 (0,49)
RapidPoint 405,500 de Siemens	105	14,48 (0,17)	106	61,9 (0,44)	122	20,28 (0,26)	101	17,65 (0,44)
Todos los participantes	506	13,51 (0,75)	513	61,38 (1,15)	570	19,76 (0,89)	445	18,58 (1,35)

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Contenedor que comprende fracciones de hemoglobina, donde dicho contenedor comprende al menos dos compartimentos adyacentes, donde un primer compartimento comprende una fracción líquida estabilizada de O<sub>2</sub>Hb (oxihemoglobina) y un segundo compartimento comprende una fracción líquida de MetHb (metahemoglobina).
- 10 2. Contenedor según la reivindicación 1, donde dichos al menos dos compartimentos se pueden poner en comunicación de fluido entre sí.
3. Contenedor según la reivindicación 1 o 2, donde dichos al menos dos compartimentos forman parte de un ensamblaje dispuesto para almacenar por separado dichas fracciones de hemoglobina.
- 15 4. Contenedor según alguna de las reivindicaciones 1 a 3, donde está presente una fracción de hemoglobina adicional de COHb (carboxihemoglobina) en el primer o en el segundo compartimentos.
5. Contenedor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la O<sub>2</sub>Hb, la MetHb y/o la COHb están derivadas de sangre de mamífero.
- 20 6. Contenedor según la reivindicación 5, donde la sangre de mamífero es sangre bovina o sangre humana.
7. Contenedor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde otras fracciones de hemoglobina están presentes o en el primer y/o en el segundo compartimentos.
- 25 8. Contenedor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la O<sub>2</sub>Hb se estabiliza usando una MetHb reductasa.
- 30 9. Contenedor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde los al menos dos compartimentos forman parte de un ensamblaje dispuesto para almacenar por separado las fracciones de hemoglobina, donde el ensamblaje comprende además una disposición de mezclado que proporciona un canal de comunicación entre los al menos dos compartimentos para mezclar las fracciones de hemoglobina directamente antes del uso.
- 35 10. Contenedor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde un analito adicional está presente en un compartimento de dicho contenedor.
11. Contenedor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la bilirrubina está presente en un compartimento de dicho contenedor.
- 40 12. Kit para determinar la fiabilidad de un dispositivo de cooximetría, donde el kit comprende (i) al menos un contenedor tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y (ii) instrucciones para mezclar las fracciones de hemoglobina contenidas en el contenedor para obtener una o más muestras de control, y para medir de la concentración de una fracción de hemoglobina presente usando dicho dispositivo.
- 45 13. Kit según la reivindicación 12, donde el kit está listo para usar una vez que las fracciones de hemoglobina han sido mezcladas entre ellas.
14. Método para determinar la fiabilidad de un dispositivo de cooximetría, que comprende las siguientes etapas sucesivas:
- 50 a) mezclar las fracciones de hemoglobina presentes en un contenedor tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 con el objetivo de obtener una muestra de control con concentraciones definidas de fracciones de hemoglobina;
- b) medir, por medio del dispositivo, la concentración de una fracción de hemoglobina presente en la muestra de control de la etapa a);
- 55 c) determinar la fiabilidad del dispositivo basándose en la diferencia entre (i) las concentraciones conocidas de las fracciones de hemoglobina de la muestra obtenida al final de la etapa a) y (ii) el resultado de la medición de la medición de la etapa b).

