

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 373**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61K 35/19 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2015 PCT/US2015/034967**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15191632**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2015 E 15805897 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3154338**

54 Título: **Estabilización de trombocitos a temperaturas ambiente**

30 Prioridad:

10.06.2014 US 201462010151 P

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

09.10.2020

73 Titular/es:

**BIOMATRICA, INC. (100.0%)
5627 Oberlin Drive, Suite 120
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**MULLER, ROLF;
DESHARNAIS, JOEL;
WILKINSON, STEVEN, P.;
ARENDR, VICTORIA y
DIAZ, PAUL**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 786 373 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

Estabilización de trombocitos a temperaturas ambiente

Referencia cruzada

Antecedentes de la invención

5 1. Campo técnico

La presente invención se refiere en general a la estabilización de uno o más trombocitos a temperaturas ambiente. En particular, la invención se refiere a formulaciones, composiciones, artículos de fabricación, kits y procedimientos para el almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos metabólicamente activos a temperaturas ambiente.

10 Antecedentes

La sangre entera es una mezcla compleja de células, ácidos nucleicos, proteínas y diversos otros analitos. En particular, los componentes de la sangre incluyen, pero no están limitados a: células, tal como leucocitos (monocitos, linfocitos y granulocitos), eritrocitos, trombocitos y células tumorales circulantes; moléculas de ácido nucleico, tal como ADN libre circulante (ADNlc); polipéptidos, tal como lipoproteínas, albúmina y proteínas séricas, y otros diversos analitos.

Los trombocitos o plaquetas son células anucleadas que juegan un papel clave en la coagulación de la sangre. Los trombocitos son pequeñas células en forma de disco que circulan en la sangre de los mamíferos y están involucrados en la hemostasia. Los trombocitos secretan una amplia variedad de factores de crecimiento que ayudan a promover la coagulación de la sangre y la regeneración de los tejidos.

20 El nivel de trombocitos circulantes en un individuo sano está controlado dentro de un intervalo fisiológico de aproximadamente $(150 - 400) \times 10^3$ por mm^3 . Los niveles subóptimos de trombocitos (trombocitopenia) pueden provocar una hemorragia excesiva, mientras que los niveles que excedan las concentraciones óptimas pueden provocar la formación de trombos (coágulos de sangre) que pueden destruir los vasos sanguíneos y pueden provocar un mayor riesgo de apoplejía, émbolo pulmonar o infarto de miocardio.

25 Los trombocitos circulantes están típicamente presentes en un estado inactivado, y son mantenidos en el estado inactivado por factores producidos por las células endoteliales que revisten el lumen del vaso sanguíneo. Tras el desgarro o lesión de esta capa endotelial, los trombocitos entran en contacto con el colágeno o el factor de von Willebrand, que activa los trombocitos causando la agregación de los trombocitos (es decir, coagulación). Esta activación y agregación también puede ocurrir por la actividad enzimática de la trombina o en presencia de ADP. Tras la activación, los trombocitos liberan los contenidos de gránulos alfa y densos que incluyen factores de crecimiento y fibrinógeno que brindan asistencia en la formación de coágulos y ayudan a promover el reclutamiento de fibroblastos para promover la cicatrización de heridas. Los trombocitos activados pueden ser distinguidos de los inactivados por su forma más esférica/estelar.

35 La activación, agregación y/o liberación de numerosos factores de crecimiento y otros componentes intracelulares de los trombocitos durante la extracción de sangre entera puede dificultar enormemente la cuantificación y el análisis de estas células. La adición de diversos anticoagulantes para mantener los trombocitos inactivados a temperaturas ambiente da como resultado sólo aproximadamente 13 - 52% de trombocitos inactivados a las 24 horas, lo que hace que el análisis cuantitativo exacto de los trombocitos totales sea esencialmente imposible en este momento. Por lo tanto, existe la necesidad de formulaciones y procedimientos mejorados para estabilizar los trombocitos a temperaturas ambiente durante un tiempo suficiente para el almacenamiento y traslado de trombocitos con fines de investigación, diagnóstico y terapia.

40 El documento WO 99/55346 A1 desvela una formulación para preparación de productos sanguíneos que comprende un tampón de pH, un anticoagulante y un azúcar no reductor. El documento WO 94/22885 A1 desvela el uso de disacárido como anticoagulante. El documento WO 2012/075407 A2 desvela un agente estabilizador de la sangre que comprende un tampón de pH, un anticoagulante, un carbohidrato funcionalizado y variegina. Dichos documentos de la técnica anterior no mencionan ningún componente que sea un derivado de disacárido halogenado como es definido en el punto (iii) de la reivindicación 1 del pliego de reivindicaciones adjunto.

Sumario de la invención

50 Las formulaciones y procedimientos de la presente invención como son definidos en las reivindicaciones ventajosamente proporcionan la estabilización de los trombocitos a temperaturas ambiente y estas células permanecen funcionales y conservan la capacidad de ser activadas tras la extracción de sangre durante un período de al menos 24 horas, lo que aumenta considerablemente el tiempo de almacenamiento y traslado de trombocitos sustancialmente estables para investigación, diagnóstico y posibles aplicaciones terapéuticas. Son desveladas en la presente memoria formulaciones para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos a

temperaturas ambiente, en las que los uno o más trombocitos son estabilizados durante un período de al menos seis horas. En algunas realizaciones, los uno o más trombocitos son estabilizados en un estado inactivado. En algunas realizaciones, los uno o más trombocitos están en una muestra de sangre. En algunas realizaciones, los uno o más trombocitos están en estado inactivado en una muestra de sangre. En algunas realizaciones, los uno o más trombocitos son aislados de una muestra de sangre. Al menos 90% de los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos seis horas. Al menos 90% de los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos siete horas. Los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas. La formulación comprende los componentes como son definidos en las reivindicaciones, es decir: (i) un tampón de pH; (ii) un anticoagulante; y (iii) un derivado de disacárido halogenado, en la que dicho derivado de disacárido halogenado es un disacárido diclorado o triclorado. En algunas realizaciones, el anticoagulante es EDTA o hirudina. En algunas realizaciones, el tampón de pH es solución salina tamponada con fosfato 2x o Tris-HCl.

En un aspecto de la invención, son proporcionadas formulaciones para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos en un estado inactivado en una muestra de sangre a temperaturas ambiente, en la que los uno o más trombocitos son estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos seis horas. Al menos 90% de los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos seis horas. Los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas. La formulación comprende los componentes como son definidos en las reivindicaciones, es decir, (i) un tampón de pH, (ii) un anticoagulante y (iii) un derivado de disacárido halogenado, en la que dicho derivado de disacárido halogenado es un disacárido diclorado o triclorado. El tampón de pH puede ser solución salina tamponada con fosfato 2x o Tris-HCl. Son desveladas en la presente memoria formulaciones para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos a temperaturas ambiente, que comprenden un derivado de disacárido halogenado, en las que dicho derivado de disacárido halogenado es un disacárido diclorado o triclorado, y un anticoagulante, en las que uno o más trombocitos son estabilizados durante un período de al menos seis horas. En algunas realizaciones, los uno o más trombocitos son estabilizados en un estado inactivado. En algunas realizaciones, los uno o más trombocitos están en una muestra de sangre. En algunas realizaciones, los uno o más trombocitos son estabilizados en un estado inactivado en una muestra de sangre. En algunas realizaciones, son aislados uno o más trombocitos de una muestra de sangre. En algunas realizaciones, el anticoagulante es hirudina. En algunas realizaciones, el derivado de disacárido halogenado es seleccionado del grupo que consiste en sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido), maltosa tricloronato, 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-6-O-monodecanoato-α-D-galactopiranosido, 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-6-O-monotetradecanoato-α-D-galactopiranosido, y sus combinaciones. La formulación puede consistir esencialmente en hirudina y sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido).

En algunas realizaciones, son proporcionadas formulaciones para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos en un estado inactivado en una muestra de sangre a temperaturas ambiente, que comprende un derivado de disacárido halogenado, en las que dicho derivado de disacárido halogenado es un disacárido diclorado o triclorado, en las que los uno o más trombocitos son estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos seis horas. En algunas realizaciones, el derivado de disacárido halogenado es seleccionado preferentemente del grupo que consiste en sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido), maltosa tricloronato, 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-6-O-monodecanoato-α-D-galactopiranosido y 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-6-O-monotetradecanoato-α-D-galactopiranosido, y más preferentemente el derivado de disacárido halogenado es sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido). Las formulaciones además comprenden un anticoagulante como es definido en las reivindicaciones, preferentemente hirudina. En algunas realizaciones, el anticoagulante es hirudina. La formulación puede consistir esencialmente en hirudina y sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido).

Son desveladas en la presente memoria composiciones de uno o más trombocitos almacenados de manera sustancialmente estable que comprenden uno o más trombocitos mezclados con una formulación desvelada. Los uno o más trombocitos pueden estar en una muestra de sangre. Los uno o más trombocitos pueden ser trombocitos aislados. Los uno o más trombocitos pueden estar en un estado inactivado.

En algunas realizaciones, son desvelados en la presente memoria artículos de fabricación como son definidos en la reivindicación 7, que comprenden una formulación de las reivindicaciones 1-6 contenidas en un tubo de extracción de sangre. En algunas realizaciones, el tubo de extracción de sangre es un tubo de extracción de sangre evacuado.

Son desvelados en la presente memoria kits que comprenden un artículo de fabricación como es mencionado anteriormente y un prospecto.

En algunas realizaciones, son desvelados en la presente memoria procedimientos para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos a temperaturas ambiente, que comprenden: mezclar uno o más trombocitos de un individuo con una formulación de las reivindicaciones 1-6, en los que los uno o más trombocitos son estabilizados durante un período de al menos seis horas. Los uno o más trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado. Los uno o más trombocitos pueden estar en una muestra de sangre del individuo. Los uno o más trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado en una muestra de sangre del individuo. Uno o más trombocitos pueden ser aislados de una muestra de sangre del individuo. Al menos 90% de los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos seis horas. Al menos 90% de los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos nueve horas. En algunas realizaciones, el procedimiento además comprende activar uno o más trombocitos en un estado inactivado, por la adición de un agente activador para promover la agregación de los trombocitos. En algunas realizaciones, el agente activador es ADP. El individuo puede ser un animal. El individuo puede ser un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano.

En algunas realizaciones, son desvelados en la presente memoria procedimientos para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos en un estado inactivado en una muestra de sangre a temperaturas ambiente, que comprenden mezclar una muestra de sangre de un individuo con una formulación de las reivindicaciones 1-6, en los que uno o más trombocitos son estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos seis horas. Al menos 90% de los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos seis horas. Los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas. La muestra de sangre puede ser mezclada con la formulación de estabilización en el momento en que es extraída la muestra de sangre del individuo para estabilizar sustancialmente los uno o más trombocitos en el estado inactivado tras la extracción de sangre del individuo. El procedimiento puede además comprender activar uno o más trombocitos por la adición de un agente activador. El agente activador puede ser ADP. En dichos procedimientos, el individuo puede ser un animal, más preferentemente un mamífero, e incluso más preferentemente un ser humano.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones, artículos de fabricación, y procedimientos para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos a temperaturas ambiente, como es definido en las reivindicaciones. Los uno o más trombocitos pueden ser almacenados en un estado inactivado, pero activable, en una muestra de sangre. En un aspecto, las formulaciones descritas en la presente memoria mantienen beneficiosamente la integridad de los trombocitos inactivados, metabólicamente activos, que pueden después ser analizados para activación o que pueden ser usados en aplicaciones terapéuticas para promover la coagulación de la sangre en un paciente.

Como es usado en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos, y/o etapas del tipo descritos en la presente memoria que se volverán aparentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la presente divulgación y etc.

Por el término "aproximadamente", como es usado en la presente memoria al hacer referencia a un valor mensurable tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, o $\pm 5\%$, o incluso $\pm 1\%$ del valor especificado, dado que tales variaciones son adecuadas para las composiciones desveladas o para llevar a cabo los procedimientos desvelados.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente comprendido por una persona con experiencia en la técnica a la que pertenece esta invención.

Son proporcionadas formulaciones para almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos metabólicamente activos a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, los trombocitos son aislados de una muestra de sangre. En algunas realizaciones, los trombocitos están en una muestra de sangre. Los trombocitos pueden estar inactivos. Las formulaciones de estabilización comprenden un derivado de disacárido halogenado, en las que dicho derivado de disacárido halogenado es un disacárido diclorado o triclorado, un anticoagulante y un tampón de pH. Las formulaciones son capaces de estabilizar al menos 60%, 70%, 80% o incluso 90% de trombocitos inactivados, metabólicamente activos, en una muestra de sangre a temperaturas ambiente durante un período de al menos 6 horas, o al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas.

El término "temperatura ambiente", como es usado en la presente memoria, se refiere a temperaturas comunes de los espacios interiores. La temperatura ambiente puede ser de 15 a 32°C. La temperatura ambiente puede ser de 20 a 27°C.

- Como es definido en las reivindicaciones, son proporcionadas formulaciones para almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos inactivados, metabólicamente activos, en una muestra de sangre a temperaturas ambiente. Las formulaciones de estabilización comprenden un tampón de pH, un anticoagulante y un derivado de disacárido halogenado, en las que dicho derivado de disacárido halogenado es un disacárido diclorado o triclorado. Las formulaciones son capaces de estabilizar al menos 60%, 70%, 80% o incluso 90% de trombocitos inactivados, metabólicamente activos, en una muestra de sangre a temperaturas ambiente durante un período de al menos 6 horas, o al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas.
- En otro aspecto, las formulaciones reivindicadas son mezcladas con una muestra de sangre para producir uno o más trombocitos inactivados sustancialmente estables en una preparación de sangre entera. Son proporcionadas composiciones que comprenden uno o más trombocitos purificados o sustancialmente purificados mezclados con una formulación de estabilización de la presente invención, como es definido en las reivindicaciones.

Reactivos de formulación

A. Tampones de pH

- Como es definido en las reivindicaciones, las formulaciones y composiciones descritas en la presente memoria para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos incluyen uno o más tampones de pH. En algunas realizaciones, el tampón de pH es cualquiera de un gran número de compuestos conocidos en la técnica por su habilidad de resistir cambios en el pH de una solución, tal como en una solución acuosa en la que el tampón de pH está presente. La selección de uno o más tampones de pH particulares para su inclusión en una composición para almacenamiento estable puede ser realizada en base a la presente divulgación y de acuerdo con las prácticas rutinarias en la técnica, y puede estar influida por diversos factores, incluyendo el pH que se desea mantener, la naturaleza de la muestra biológica, las condiciones del disolvente a ser empleado, los demás componentes de la formulación a ser usados, y otros criterios. Por ejemplo, típicamente es empleado un tampón de pH a un pH que está dentro de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 unidad de pH de una constante de disociación de protones (pK_a) que es una característica del tampón.

- Los ejemplos no limitativos de tampones de pH incluyen ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido sulfosalicílico, ácido sulfoisotáltico, ácido oxálico, borato, CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico), CAPSO (ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico), EPPS (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinapropanosulfónico), HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)piperazina-1-etanosulfónico), MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), MOPSO (ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico), PIPES (ácido 1,4-piperazinedietanosulfónico), TAPS (ácido N-[tris(hidroxi-metil)metil]-3-aminopropanosulfónico), TAPSO (ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroxi-metil)metilamino]-1-propanosulfónico), TES (ácido N-[tris(hidroxi-metil)metil]-2-aminoetanosulfónico), bicina (N,N-bis(2-hidroxi-etil)glicina), tricina (N-[tris(hidroxi-metil)metil]glicina), tris (tris(hidroxi-metil)aminometano) y bis-tris (2-[bis(2-hidroxi-etil)amino]-2-(hidroxi-metil)-1,3-propanodiol). Los tampones de pH, incluyendo los expuestos en la Tabla 1, pueden tener un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, o 9,0.

B. Polioles

- Los polioles son alcoholes polihídricos que contienen dos o más grupos hidroxilo y tienen la fórmula general $H(CHOH)_nH$, en la que n es un número entero seleccionado de 2 a 7 inclusive. Los polioles difieren con respecto a la longitud de la cadena, la mayoría de los polioles que tienen cinco o seis cadenas de carbono son derivados de pentosas (azúcares de cinco carbonos) y hexosas (azúcares de seis carbonos); sin embargo, también existen polioles con cadenas de carbono más cortas y más largas. Los polioles de ejemplo incluyen, pero no están limitados a, glicol, glicerol, eritritol, treitol, arabitol, xilitol, ribitol, adonitol, manitol, sorbitol, galactitol, fucitol, iditol e inositol. La selección de uno o más polioles particulares para su inclusión en una composición para almacenamiento sustancialmente estable puede ser realizada en base a la presente divulgación presente y de acuerdo con las prácticas rutinarias en la técnica, y puede estar influenciada por una variedad de factores que incluyen otros componentes de formulación. El poliol presente en la formulación puede ser un poliol pentoso. El poliol puede ser adonitol. El poliol puede estar presente en una concentración entre 20 - 100 mM, o entre aproximadamente 25 - 75 mM. El poliol puede ser un poliol pentoso y puede estar presente en una concentración entre 20 - 100 mM, o entre aproximadamente 25 - 75 mM. El poliol puede ser adonitol y puede estar presente en una concentración entre 20 - 100 mM, o entre aproximadamente 25 - 75 mM.

C. Derivados de disacáridos

Las formulaciones para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos inactivados en una muestra de sangre entera a temperaturas ambiente, incluyendo aquellas de la Tabla 1, incluyen al menos un derivado de disacárido halogenado, en las que el derivado de disacárido halogenado es un disacárido diclorado o triclorado

como es definido en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, tales disacáridos diclorados o triclorados inesperadamente son capaces de almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos inactivados, ya sea solos o en presencia de sólo un tampón. Los derivados de disacáridos halogenados son conocidos, por ejemplo, véase la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2014/0065062, e incluyen sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido), maltosa tricloronato, 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-6-O-monodecanoato-α-D-galactopiranosido, y 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-6-O-monotetradecanoato-α-D-galactopiranosido. La selección de uno o más derivados de disacáridos halogenados particulares, siendo un disacárido diclorado o triclorado para inclusión en una composición para almacenamiento sustancialmente estable puede ser realizada en base a la presente divulgación y de acuerdo con las prácticas habituales en la técnica, y puede verse influida por diversos factores, incluyendo otros componentes de formulación. El derivado de disacárido halogenado puede ser sucralosa y está presente a aproximadamente 1,0 - 50,0 mM. El derivado de disacárido halogenado puede ser sucralosa y está presente a aproximadamente 10,0 - 30,0 mM. El derivado de disacárido halogenado puede ser sucralosa y está presente a aproximadamente 25,0 mM.

15 **D. Carbohidratos funcionalizados**

Las formulaciones, incluyendo aquellas de la Tabla 1, pueden incluir un carbohidrato funcionalizado. Algunos ejemplos de carbohidratos funcionalizados incluyen sucralfato u octasulfato de sacarosa. La concentración de carbohidratos funcionalizados en las formulaciones y composiciones de la presente, incluyendo aquellas de la Tabla 1, puede ser de 0,005 - 1,0 mM o aproximadamente 0,25 a 0,5 mM.

20 **E. Azúcares no reductores**

Las formulaciones y composiciones para almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos a temperaturas ambiente pueden incluir al menos un azúcar no reductor. Las formulaciones y composiciones para almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos viables, inactivados, en una muestra de sangre entera a temperaturas ambiente pueden incluir al menos un azúcar no reductor. Como es usado en la presente memoria, "azúcares no reductores" se refiere a moléculas de carbohidratos que carecen de un grupo aldehído funcional. Los azúcares no reductores de ejemplo incluyen sacarosa y trehalosa. El azúcar no reductor puede ser sacarosa. El azúcar no reductor puede ser trehalosa. La trehalosa puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1,0 - 50 mM. La trehalosa puede estar presente en una concentración de aproximadamente 10,0 - 30 mM. La trehalosa puede estar presente en una concentración de aproximadamente de 25 mM.

30 **F. Anticoagulantes**

Un anticoagulante está incluido en las formulaciones reivindicadas. Tales anticoagulantes son conocidos en la técnica. Los ejemplos de anticoagulantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), hirudina, heparina y citrato de sodio. En algunas realizaciones, el anticoagulante es hirudina. La hirudina puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1,0 - 50 µg/ml. La hirudina puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1,0 - 25 µg/ml. La hirudina puede estar presente en una concentración de aproximadamente 10-20 µg/ml.

Formulaciones de ejemplo para estabilización de trombocitos a temperaturas ambiente

Las formulaciones y procedimientos de la presente invención como son definidos en las reivindicaciones ventajosamente proporcionan el almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos a temperaturas ambiente durante un período de al menos seis horas. Las formulaciones y procedimientos de la presente invención como son definidos en las reivindicaciones ventajosamente proporcionan el almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos en su estado inactivado, circulante natural, en una muestra de sangre a temperaturas ambiente, en los que las células retienen la capacidad de ser activadas tras la extracción por un período de al menos seis horas. Al menos 90% de los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos seis horas. Los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas.

Las formulaciones para el almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos comprenden un derivado de disacárido halogenado, en las que dicho derivado de disacárido halogenado es un disacárido diclorado o triclorado, un anticoagulante, y además comprenden un tampón de pH. El anticoagulante puede ser pulverizado y secado en el tubo, recipiente, o vaso de extracción de sangre antes de la extracción de la muestra de sangre del individuo. El anticoagulante puede ser añadido directamente a las formulaciones descritas en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, el tampón de pH es Tris-HCl, y el anticoagulante es EDTA o hirudina. En algunas realizaciones, el disacárido halogenado es sucralosa y el anticoagulante es hirudina.

55 Las formulaciones para el almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos inactivados a temperaturas ambiente incluyen las formulaciones de ejemplo proporcionadas en la Tabla 1.

TABLA 1. Formulaciones de ejemplo para estabilización de trombocitos inactivados, metabólicamente activos, en una muestra de sangre humana a temperaturas ambiente

Formulación	Tris-HCl (mM)	Adonitol (mM)	Trehalosa (mM)	Octasulfato de sacarosa (mM)	Sucralosa (mM)
A	2,5	100		1,0	
B	2,5	50	25,0	1,0	
C	2,5		25,0	1,0	
D	2,5	50	25,0	0,5	
E	2,5				25
F					25

Procedimientos de preparación de formulaciones de ejemplo

5 Las Formulaciones de ejemplo A-F de la Tabla 1, en las que las Formulaciones E y F son realizaciones de la invención como es definida en las reivindicaciones, son preparadas usando materiales comercialmente disponibles de los proveedores y la preparación de tales formulaciones es lograda usando los procedimientos desvelados en la presente memoria, así como otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

10 Componentes sólidos previamente pesados son añadidos a un recipiente adecuado, tal como una botella cuadrada, a la que son añadidos los componentes acuosos. La mezcla de reacción es agitada, por ejemplo, por agitación, hasta que los componentes sólidos hayan sido disueltos completamente y después el pH de la mezcla es ajustado al pH deseado usando un ácido adecuado, por ejemplo, ácido clorhídrico. Después, las formulaciones resultantes son esterilizadas, por ejemplo, usando un filtro de 0,22 micrones, y almacenadas a temperatura ambiente.

15 En un ejemplo, una preparación de 50 ml de una Fórmula A 20X es preparada de la siguiente manera: 15,2034 g de adonitol (Calbiochem, catálogo #121739) y 1,251 g de sal potásica de octasulfato de sacarosa (Toronto Research Chemicals, catálogo #S69900) son añadidos a una botella cuadrada. Es añadido un volumen de 30 ml de agua, seguido por la adición de 2,5 ml de Tris-HCl (Invitrogen, catálogo #15567-027). Es añadida agua adicional para el control de calidad de la formulación hasta un volumen total final de 50 ml. La mezcla es agitada hasta que sea disuelta completamente, y es añadido ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,51. La solución es filtrada de forma estéril (tamaño de poro de 0,22 µm) bajo vacío para obtener la formulación resultante.

25 En otro ejemplo, una preparación de 50 ml de una Fórmula B 20X es preparada de la siguiente manera: 7,5994 g de adonitol, 9,4997 g de dihidrato de D-(+)-trehalosa (Fluka, catálogo #90210) y 1,25 g de sal potásica de octasulfato de sacarosa son añadidos a una botella cuadrada. Es añadido un volumen de 30 ml de agua, seguido de la adición de 2,5 ml de Tris-HCl (Invitrogen, catálogo #15567-027). Es añadida agua adicional para el control de calidad de la formulación hasta un volumen total final de 50 ml. La mezcla es agitada hasta que sea disuelta completamente, y es añadido ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,51. La solución es filtrada de forma estéril (tamaño de poro de 0,22 µm) bajo vacío para obtener la formulación resultante.

30 En otro ejemplo, una preparación de 50 ml de una Fórmula C 20X es preparada de la siguiente manera: 9,5003 g de deshidrato de D-(+)-trehalosa y 1,2502 g de sal potásica de octasulfato de sacarosa son añadidos en una botella cuadrada. Es añadido un volumen de 30 ml de agua, seguido de la adición de 2,5 ml de Tris-HCl (Invitrogen, catálogo #15567-027). Es añadida agua adicional para el control de calidad de la formulación hasta un volumen total final de 50 ml. La mezcla es agitada hasta que sea disuelta completamente, y es añadido ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,52. La solución es filtrada de forma estéril (tamaño de poro de 0,22 µm) bajo vacío para obtener la formulación resultante.

35 En otro ejemplo, una preparación de 50 ml de una Fórmula D 20X es preparada de la siguiente manera: 7,5994 g de adonitol, 9,5003 g de dihidrato de D-(+)-trehalosa y 0,625 g de sal potásica de octasulfato de sacarosa. Es añadido un volumen de 30 ml de agua, seguido de la adición de 2,5 ml de Tris-HCl (Invitrogen, catálogo #15567-027). Es añadida agua adicional para el control de calidad de la formulación hasta un volumen total final de 50 ml. La mezcla es agitada hasta que sea disuelta completamente, y es añadido ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,51. La solución es filtrada de forma estéril (tamaño de poro de 0,22 µm) bajo vacío para obtener la formulación resultante.

40

5 En otro ejemplo, una preparación de 50 ml de una Fórmula E 20X es preparada de la siguiente manera: 9,9997 g de sucralosa (Sigma, catálogo #69293) son añadidos a una botella cuadrada. Es añadido un volumen de 30 ml de agua, seguido de la adición de 2,5 ml de Tris-HCl (Invitrogen, catálogo #15567-027). Es añadida agua adicional para el control de calidad de la formulación hasta un volumen total final de 50 ml. La mezcla es agitada hasta que sea disuelta completamente y es añadido ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,54. La solución es filtrada de forma estéril (tamaño de poro de 0,22 µm) bajo vacío para obtener la formulación resultante.

10 En otro ejemplo, una preparación de 50 ml de una Fórmula F 20X es preparada de la siguiente manera: 9,9993 g de sucralosa (Sigma, catálogo 69293) son añadidos a una botella cuadrada. Es añadida agua adicional para el control de calidad de la formulación hasta un volumen total final de 50 ml. La mezcla es agitada hasta que sea disuelta completamente, proporcionando una solución con un pH de 7,54. La solución es filtrada de forma estéril (tamaño de poro de 0,22 µm) bajo vacío para obtener la formulación resultante.

Trombocitos estabilizados purificados

15 Los uno o más trombocitos sustancialmente estabilizados en una muestra de sangre a temperaturas ambiente son purificados usando procedimientos bien conocidos empleados por los expertos en la técnica. Los aparatos y kits para purificación de trombocitos de la sangre son bien conocidos (por ejemplo, véanse las Patentes de los Estados Unidos Núm.: 5.234.593; 6.315.706 y 7.708.152). Los trombocitos pueden ser purificados usando una bolsa de PC (concentrados de plaquetas) preparada tras la extracción de sangre en una bolsa y la aféresis de PC obtenida por el uso de un dispositivo de extracción de componentes de sangre. Estos procedimientos separan los trombocitos de la sangre usando separación centrífuga. Las células viables metabólicamente activas, intactas, sustancialmente
20 estabilizadas, pueden ser purificadas ventajosamente por cromatografía de afinidad o análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando anticuerpos generados contra proteínas y receptores de membrana de tipo salvaje nativa, y cuyo procedimiento no es posible usando otras formulaciones para almacenamiento que desnaturalizan estas proteínas celulares.

25 Los uno o más trombocitos purificados pueden ser posteriormente almacenados en las formulaciones descritas en la presente memoria durante períodos prolongados antes de su análisis o uso.

Artículos de fabricación

30 En ciertas realizaciones, son proporcionados artículos de fabricación como son definidos en la reivindicación 7, que comprenden una formulación de las reivindicaciones 1-6, contenida dentro de un tubo, recipiente o vaso de extracción de sangre adecuado. Estos artículos de fabricación pueden ser usados para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más componentes sanguíneos por la estabilización de uno o más componentes sanguíneos en el momento de la extracción de la sangre. En ciertas realizaciones, el tubo de extracción de sangre es un tubo de extracción de sangre evacuado que tiene una presión inferior a la atmosférica para retirar un volumen predeterminado de sangre entera.

Kits

35 Los kits pueden comprender cualquiera de los artículos de fabricación como son definidos en las reivindicaciones y un prospecto. Los componentes del kit pueden ser suministrados en un medio de empaque, tal como una caja de plástico compartimentada, preferentemente con un revestimiento sellable herméticamente para que los contenidos del kit puedan ser esterilizados y sellados para almacenamiento.

Procedimientos para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos en una muestra de sangre a temperaturas ambiente

40 Son descritos en la presente memoria procedimientos para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos a temperaturas ambiente. Los procedimientos son para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos en un estado inactivado en una muestra de sangre a temperatura ambiente.

45 Como es definido en la reivindicación 8, los procedimientos comprenden mezclar una muestra de sangre con una formulación de las reivindicaciones 1-6 para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos a temperaturas ambiente durante un período de al menos seis horas. Los uno o más trombocitos pueden ser aislados de una muestra de sangre. Los uno o más trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado. Al menos 90% de los trombocitos pueden permanecer en un estado inactivado durante un período de al menos seis horas. Los trombocitos pueden ser estabilizados en un estado inactivado durante un período de al menos 7 horas, al menos 8
50 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas.

Los procedimientos comprenden mezclar una muestra de sangre con una formulación para almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos viables como es definido en la reivindicación 8.

Los procedimientos comprenden mezclar una muestra de sangre con una formulación de las reivindicaciones 1-6 para almacenamiento sustancialmente estable de trombocitos activables, viables, en una muestra de sangre, como es reivindicado en la reivindicación 8.

5 Los tubos, bolsas, recipientes y vasos de extracción de sangre son bien conocidos en la técnica y han sido empleados por los médicos durante décadas. La extracción de sangre para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más componentes sanguíneos puede ser obtenida de un individuo, donante o paciente usando cualquier procedimiento o aparato comúnmente empleado por los expertos en la técnica, tal como venipuntura o punción del dedo. Cuando la sangre es extraída por venipuntura, una formulación descrita en la presente memoria puede estar ubicada dentro del tubo de extracción de sangre, por ejemplo, un tubo evacuado (Vacutainer, Becton Dickenson o
10 Vacuette, Greiner) en el momento en que es obtenida la muestra de sangre del donante o paciente. La formulación de estabilización puede ser añadida a una muestra de sangre entera ya obtenida, preferentemente inmediatamente o poco después de su extracción.

Los procedimientos descritos en la presente memoria pueden usar los artículos de fabricación y kits desvelados.

Son presentados los siguientes ejemplos.

15 **Ejemplo 1: Estabilización de trombocitos inactivos en una muestra de sangre humana durante un período de al menos 22 horas a temperatura ambiente**

Este ejemplo describe formulaciones para estabilización de trombocitos inactivados que continúan siendo capaces de ser activados después de ser almacenados durante un período de 22 horas a temperatura ambiente.

20 Son extraídas muestras de sangre entera de seis donantes humanos usando tubos de extracción revestidos de hirudina comercialmente disponibles (Roche Diagnostics), las muestras de sangre son agrupadas y, en las tres horas siguientes a la extracción, las muestras de sangre son procesadas. Una alícuota de 300 µL de cada muestra de sangre entera es transferida a un tubo Eppendorf en una proporción de 1:20 con 15 µL de la formulación estabilizadora A, B, C o D de la Tabla 1, ya sea antes o después de la adición de la formulación estabilizadora, y las mezclas son mantenidas a temperaturas ambiente durante períodos de tiempo predeterminados antes de ser analizadas. Un
25 volumen igual de sangre entera es añadido a cada muestra de control, y cada muestra es almacenada a temperatura ambiente en ausencia de la formulación estabilizadora y es procesada en paralelo con las muestras de prueba.

A 300 µL de cada mezcla y control, son añadidos 300 µL de NaCl 0,9% y 20 µL de la solución ADP proporcionada para promover la activación de los trombocitos y las muestras son analizadas usando un analizador multiplaca (Roche Diagnostics). La actividad de los trombocitos en cada condición es medida inmediatamente después de la preparación de la muestra (Tiempo 0) usando el analizador multiplaca y la prueba ADP de acuerdo con las instrucciones del
30 fabricante. La actividad de los trombocitos también es medida en puntos de tiempo de 3 horas, 6 horas, 9 horas y 22 horas. La actividad de los trombocitos en cada condición es normalizada a su medición de Tiempo 0. Después, los datos de los seis donantes son promediados. Los datos son mostrados en la Tabla 2.

35 TABLA 2. Estabilización de trombocitos activables, viables, en una muestra de sangre humana durante al menos 22 horas

Tiempo (hr)	Control	Formulación A	Formulación B	Formulación C	Formulación D
0	100*	100	100	100	100
3	93	110	112	96	98
6	82	107	111	101	95
9	77	115	114	101	93
22	59	91	92	74	90

* Los valores son mostrados como la actividad presente restante con relación al Tiempo 0

40 Como es mostrado en la Tabla 2, tras el período de incubación de 9 horas, la media de disminución de la actividad de los trombocitos en la condición de control de NF es de -23% en comparación con +15%, +14%, +1% y -7% para las Formulaciones A, B, C y D de la Tabla 2, respectivamente. Tras un período de incubación de 22 horas, aún es detectada una actividad significativa de los trombocitos con una media de disminución de la actividad de los

trombocitos en la condición de control de NF de -41%, en comparación con -9%, -8%, -26% y -10% para las Formulaciones A, B, C y D de la Tabla 2, respectivamente.

5 Las formulaciones de la Tabla 1 que comprenden un derivado de disacárido halogenado, sucralosa, son caracterizadas como ha sido descrito anteriormente, y también son identificadas como poseedoras de una actividad estabilizadora de los trombocitos en sangre entera durante al menos 22 horas (Tabla 3). En este estudio, estas formulaciones, como es expuesto en la Tabla 1, son incorporadas en los tubos de extracción de sangre bajo vacío con hirudina antes de la extracción de sangre.

TABLA 3. Estabilización de trombocitos activables, viables, en una muestra de sangre humana durante al menos 22 horas

Formulación	Tiempo 0	3 horas	6 horas	9 horas	22 Horas
Control	100	89	69	58	60
E	100	100	99	98	97
F	100	94	87	80	73

* Los valores son mostrados como la actividad presente restante con relación al Tiempo 0

10

Durante la incubación de la sangre a temperatura ambiente, la actividad de los trombocitos en la condición de control de NF disminuyó en -40% alrededor del punto de tiempo de 22 horas, en comparación con -3% para la Fórmula E y -27% para la Fórmula F de la Tabla 1.

15

REIVINDICACIONES

1. Una formulación para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos a temperaturas ambiente, que comprende
 - (i) un tampón de pH;
 - 5 (ii) un anticoagulante; y
 - (iii) un derivado de disacárido halogenado, en las que dicho derivado de disacárido halogenado es un disacárido diclorado o triclorado;

en la que los uno o más trombocitos son estabilizados durante un período de al menos seis horas.
- 10 2. La formulación de la reivindicación 1, en la que uno o más trombocitos a) son estabilizados en un estado inactivado; b) están en una muestra de sangre; o c) son aislados de una muestra de sangre.
3. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el tampón de pH es Tris-HCl o solución salina tamponada con fosfato 2x.
4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la el anticoagulante es hirudina o EDTA.
- 15 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el derivado de disacárido halogenado es seleccionado del grupo que consiste en sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido), maltosa tricloronato, 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-6-O-monodecanoato-α-D-galactopiranosido, 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-6-O-monotetradecanoato-α-D-galactopiranosido, y sus combinaciones.
- 20 6. La formulación de la reivindicación 1, en la que la formulación consiste esencialmente en hirudina y sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido).
7. Un artículo de fabricación, que comprende la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 contenida dentro de un tubo de extracción de sangre, o un tubo de extracción de sangre evacuado.
- 25 8. Un procedimiento para almacenamiento sustancialmente estable de uno o más trombocitos a temperaturas ambiente, que comprende: mezclar los uno o más trombocitos de un individuo con una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que los uno o más trombocitos son estabilizados durante un período de al menos seis horas.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, que además comprende activar uno o más trombocitos por la adición de un agente activador para promover la agregación de trombocitos.
- 30 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el agente activador es ADP.