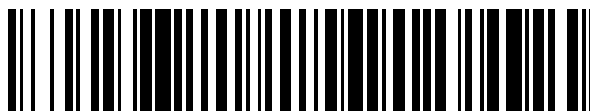


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 201**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)
A61B 5/15 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2015 PCT/US2015/034969**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15191634**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2015 E 15807020 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3155091**

54 Título: **Estabilización de células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperaturas ambiente**

30 Prioridad:
10.06.2014 US 201462010237 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2021

73 Titular/es:
**BIOMATRICA, INC. (100.0%)
5627 Oberlin Drive, Suite 120
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:
**MULLER, ROLF;
RABAN, ROBYN;
WHITNEY, SCOTT y
DIAZ, PAUL**

74 Agente/Representante:
GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 812 201 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 células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperaturas ambiente

Referencia cruzada

5 [0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 62/010,237, presentada el 10 de junio de 2014.

Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 [0002] La presente invención se refiere en general a la estabilización de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente. En particular, la invención se refiere a formulaciones, composiciones, artículos de fabricación, kits y procedimientos para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente.

2. Antecedentes

15 [0003] La sangre entera es una mezcla compleja de células, ácidos nucleicos, proteínas y varios otros analitos. En particular, los componentes sanguíneos incluyen, pero no se limitan a: células, tales como leucocitos (monocitos, linfocitos y granulocitos), eritrocitos, trombocitos y células tumorales circulantes; moléculas de ácido nucleico, como un ADN circulante libre (ADNcf); polipéptidos, tales como lipoproteínas, albúmina y proteínas séricas; y otros diversos analitos.

20 [0004] Los eritrocitos o glóbulos rojos (RBC) son células bicóncavas flexibles empaquetadas con hemoglobina que transportan oxígeno por todo el cuerpo. Los glóbulos rojos son el componente de sangre entera más denso y, por lo tanto, se pueden separar fácilmente de la sangre entera, por ejemplo, por centrifugación o incluso permitiendo que se asiente bajo la fuerza de la gravedad. Los glóbulos rojos empaquetados pueden transfundirse nuevamente a un paciente donante (transfusión autóloga) o transfundirse a un paciente con un tipo de sangre compatible, por ejemplo, con un tipo de antígeno A, B, AB, O y RH apropiado. Los leucocitos o glóbulos blancos (WBC) son un arreglo diverso de tipos de células, por ejemplo, linfocitos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares (PMN), que están involucrados principalmente con las respuestas inmunes y la lucha contra las infecciones. Los WBC son generalmente algo menos densos que los RBC y, junto con las plaquetas, forman una capa blanca de "recubrimiento leucocitario" en la parte superior de los RBC durante la centrifugación de sangre entera. Los recubrimientos leucocitarios pueden ser una fuente útil de factores de crecimiento, células blásticas y citoquinas.

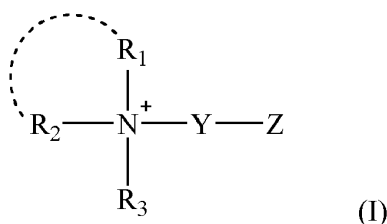
30 [0005] Se han reportado composiciones y procedimientos para estabilizar, enviar y almacenar células en una muestra de sangre a temperatura ambiente. Estas composiciones utilizadas actualmente a menudo no logran mantener la actividad metabólica de las células sanguíneas, y las células estabilizadas no retienen un tamaño y una morfología similares a las encontradas en la sangre entera, lo que complica el análisis posterior de estas células utilizando separadores y contadores celulares automatizados que clasifican y cuentan las células según el tamaño y la forma predeterminados. El documento WO 2010/132508 A2 describe composiciones y procedimientos para el almacenamiento a temperatura ambiente o elevada de ácidos nucleicos o ADN genómico. Las composiciones comprenden combinaciones de sustancias tampón, EDTA, compuestos zwitteriónicos y aditivos adicionales (catiónicos). El documento WO 2015/002729 A2, relevante de conformidad con el Artículo 54(3) EPC, describe la estabilización de las células (por ejemplo, en una muestra de sangre) a temperatura ambiente en formulaciones que comprenden sustancias tampón, EDTA, zwitteriones (betaína), Ala-Gln y otros aditivos. Ninguno de dichos documentos revela la combinación de compuestos, incluida la sucralosa, para estabilizar las células como se define en las reivindicaciones adjuntas.

45 [0006] Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas formulaciones, composiciones y procedimientos para la estabilización de las células de sangre que se mantengan en un estado intacto, metabólicamente activo que tenga un tamaño y una morfología similares a las células de la sangre entera a temperatura ambiente, por períodos prolongados. Las formulaciones, composiciones y procedimientos de la presente invención superan ventajosamente las limitaciones antes mencionadas al proporcionar células enteras intactas, viables y metabólicamente activas a temperatura ambiente durante un período de al menos 18 días. Además, las proteínas de la superficie celular unidas a la membrana expresadas en las células sustancialmente almacenadas retienen su conformación nativa en la muestra de sangre facilitando el análisis de estas células. Estas células sanguíneas estabilizadas pueden enviarse y almacenarse sin la necesidad de refrigeración o congelación, y son estables a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo, por ejemplo, días, semanas, meses o incluso años, lo que facilita la cuantificación, el análisis y/o el uso de diversos componentes sanguíneos para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas potenciales.

Breve resumen de la invención

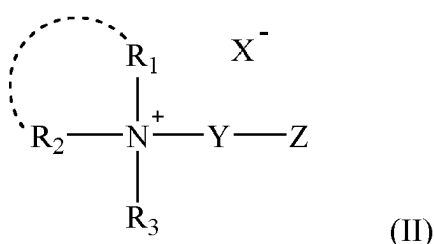
55 [0007] La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no forman parte de

la presente invención. Se describen en este documento formulaciones para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente, en las que la célula permanece metabólicamente activa después del almacenamiento a temperatura ambiente durante un período de al menos tres días. Al menos el 80 % de las células almacenadas pueden permanecer metabólicamente activas después del almacenamiento a temperatura ambiente durante un período de al menos tres días. Las células permanecen metabólicamente activas durante al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días o al menos 18 días. Al menos el 80 % de las células pueden permanecer metabólicamente activas a temperatura ambiente durante un período de al menos 18 días. La formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente puede comprender: un tampón de pH; un agente quelante; y un péptido. El tampón de pH puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 3-morfolino-2-hidroxi-propanosulfónico (MOPSO) y una combinación de los mismos. El péptido puede ser un dipéptido o un tripéptido. La secuencia de dipéptido puede ser Ala-Gln o Gly-Gly. La secuencia de tripéptido puede ser Gly-Gly-Gly. El agente quelante puede ser EDTA. La una o más células metabólicamente activas pueden seleccionarse del grupo que consiste en un leucocito, un eritrocito, una célula tumoral circulante y una combinación de los mismos. La formulación puede comprender: un tampón de pH; un agente quelante; un inhibidor de fosfatasa; y una purina. El inhibidor de fosfatasa puede ser un inhibidor de serina-treonina fosfatasa. El inhibidor de serina-treonina fosfatasa puede ser fosfato de 2-glicerol. La purina puede ser adenina o guanina. La purina puede ser adenina. La purina puede ser guanina. La formulación puede comprender además un agente quelante, y al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto catiónico, un compuesto zwitteriónico y un péptido. El agente quelante puede ser gluconato de sodio. El compuesto zwitteriónico puede ser un compuesto de fórmula (I):



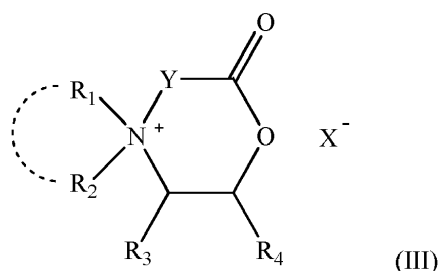
en la que R1, R2 y R3 se seleccionan independientemente de alquilo no sustituido o sustituido, arilo no sustituido o sustituido, arilalquilo no sustituido o sustituido, o R1 y R2 forman opcionalmente un anillo, Y es CH₂, CH(A), CH(A)-CH(A), CH(A)-CH(A)-CH(A), en los que A es un alquilo, arilo, arilalquilo o cualquier cadena lateral no sustituida o sustituida que se encuentra típicamente en uno de los 20 aminoácidos naturales; y Z es CO₂⁻, SO₃⁻ u OPO₃⁻. En algunas realizaciones, el compuesto catiónico se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un compuesto de fórmula (II):



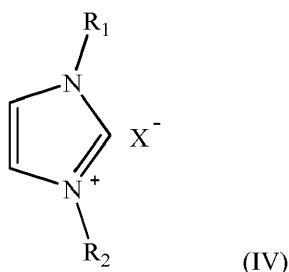
en la que R1, R2 y R3 se seleccionan independientemente de alquilo no sustituido o sustituido, arilo no sustituido o sustituido, arilalquilo no sustituido o sustituido, o R1 y R2 forman opcionalmente un anillo, Y es CH₂, CH(A), CH(A)-CH(A), CH(A)-CH(A)-CH(A), en la que A es un alquilo, arilo, arilalquilo no sustituido o sustituido o cualquier cadena lateral que se encuentra típicamente en uno de los 20 aminoácidos naturales; Z es CO₂A; y X es un anión farmacéuticamente aceptable;

(b) un compuesto de fórmula (III):



en la que R1, R2, R3 y R4 se seleccionan independientemente de alquilo no sustituido o sustituido, arilo no sustituido o sustituido, arilalquilo no sustituido o sustituido, o R1 y R2 forman opcionalmente un anillo, Y es CH₂, CH(A), CH(A)-CH(A), CH(A)-CH(A)-CH(A), en la que A es un alquilo, arilo, arilalquilo no sustituido o sustituido o cualquier cadena lateral que se encuentra típicamente en uno de los 20 aminoácidos naturales; y X es un anión farmacéuticamente aceptable; y

(c) un compuesto de fórmula (IV):



en la que R1 y R2 se seleccionan independientemente de alquilo no sustituido o sustituido, arilo no sustituido o sustituido, arilalquilo no sustituido o sustituido; y X es un anión farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, R1 y R2 de un compuesto de fórmula (I), fórmula (II) o fórmula (III) forman un anillo de morfolino, anillo de pirrolidinio, un anillo de piperidinio o un anillo de oxazinio. El compuesto zwitteriónico puede seleccionarse de los compuestos zwitteriónicos establecidos en la Tabla 1. El compuesto catiónico puede seleccionarse de los compuestos catiónicos establecidos en la Tabla 1. El compuesto zwitteriónico puede ser una sal interna cuaternaria. La sal cuaternaria puede ser N,N-dimetil-N-(2-hidroxi-etil)-3-amonio-propionato o N-etil-piperidinio-4-butilsulfonato. El compuesto catiónico o zwitteriónico puede seleccionarse del grupo que consiste en bromuro de 4-(2-etoxi-2-oxoetil)-4-etilmorfolin-4-io, bromuro de N-(2-etoxi-2-oxoetil)-3-hidroxi-N,N-bis(2-hidroxi-etil) propan-1-aminio, bromuro de 2-etoxi-N,N,N-trietil-2-oxoethanaminio, acetato de 2-((3-hidroxi-propil)dimetilamonio), acetato de 2-((2-hidroxi-propil)dimetilamonio), acetato de 2-(2-(hidroximetil)-1-metilpiperidinio-1-il), acetato de 2-((2-hidroxi-etil)dimetilamonio), acetato de 2-((2,3-dihidroxi-propil)dimetilamonio), bromuro de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-4-hidroxi-1-metilpiperidinio, acetato de 2-(4-hidroxi-1-metilpiperidinio-1-il), bromuro de 2-etoxi-N-(2-(2-hidroxi-etoxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoethanaminio, acetato de 2-((2-(2-hidroxi-etoxi)etil)dimetilamonio), acetato de 2-(bis(2-hidroxi-etil)-(metil)amonio) y bromuro de 4-(2-hidroxi-etil)-4-metil-2-oxomorfolin-4-io, acetato de 2-(bis(2-hidroxi-etil)-(metil)amonio), acetato de 2-(4-(2-hidroxi-etil)morfolino-4-io), bromuro de 4-(2-etoxi-2-oxoetil)-4-metilmorfolin-4-io, bromuro de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1-metilpirrolidinio, acetato de 2-(bencil(2-hidroxi-etil)(metil)amonio), cloruro de 3-(2,3-dihidroxi-propil)-1-metil-1H-imidazol-3-io, metilsulfato de 1,3-dimetil-1H-imidazol-3-io, bromuro de N-bencil-2-etoxi-N,N-dimetil-2-oxoethanaminio, bromuro de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1-metilpiperidinio, bromuro de N-(2-etoxi-2-oxoetil)-N,N-dimetilbenzenaminio, bromuro de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-3-hidroxi-1-metilpiperidinio, cloruro de 3-(2-(2-hidroxi-etoxi)etil)-1-metil-1H imidazol-3-io, cloruro de 3-(2-(2-(2-hidroxi-etoxi)etoxi)etil)-1-metil-1H-imidazol-3-io, bromuro de 1-metil-3-tetradecil-1H-imidazol-3-io, bromuro de N-(2-etoxi-2-oxoetil)-N,N-dimetilciclohexanaminio y 3-((2-hidroxi-etil)dimetil-amonio)propanoato. El péptido puede tener la secuencia de aminoácidos Ala-Gln, Gly-Gly o Gly-Gly-Gly. El péptido puede tener la secuencia de aminoácidos Ala-Gln. El péptido puede tener la secuencia de aminoácidos Gly-Gly. El péptido puede tener la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly. La formulación puede comprender además un tampón de acetato, sucralosa, glucosa, cloruro de potasio, mioinositol, N-metilglucamina, cloruro de magnesio o una combinación de los mismos. La una o más células metabólicamente activas pueden seleccionarse del grupo que consiste en un leucocito, un eritrocito, una célula tumoral circulante y una combinación de los mismos. La una o más células metabólicamente activas pueden ser un leucocito. La una o más células metabólicamente activas pueden ser un eritrocito. La una o más células metabólicamente activas pueden ser una célula tumoral circulante. La formulación puede seleccionarse de las formulaciones establecidas en la Tabla 2. El tampón de pH puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y ácido 3-morfolino-2-hidroxi-propanosulfónico (MOPSO), el agente quelante es EDTA, y el péptido puede ser un dipéptido o un tripéptido. El inhibidor de la fosfatasa puede ser fosfato de 2-glicerolol y la purina puede ser adenina o guanina. El inhibidor de la fosfatasa puede ser fosfato de 2-glicerol y la purina puede ser adenina.

5 [0008] En este documento se describen composiciones de uno o más leucocitos metabólicamente activos almacenados de forma estable, que comprenden uno o más leucocitos metabólicamente activos mezclados con una formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas. El uno o más leucocitos metabólicamente activos pueden purificarse y almacenarse en las formulaciones para un almacenamiento sustancialmente estable.

10 [0009] En este documento se describen composiciones de uno o más eritrocitos metabólicamente activos almacenados de manera estable que comprenden uno o más eritrocitos metabólicamente activos mezclados con una formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas. El uno o más eritrocitos metabólicamente activos pueden purificarse y almacenarse en las formulaciones para un almacenamiento sustancialmente estable.

15 [0010] En el presente documento se describen composiciones de una o más células tumorales circulantes metabólicamente activas almacenadas de manera sustancialmente estable que comprenden una o más células tumorales circulantes metabólicamente activas mezcladas con una formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas. La una o más células tumorales circulantes metabólicamente activas pueden purificarse y almacenarse en las formulaciones para un almacenamiento sustancialmente estable.

20 [0011] En este documento se describen artículos de fabricación que comprenden una formulación de cualquiera de las formulaciones descritas en este documento contenidas dentro de un tubo de recolección de sangre. El tubo de recolección de sangre puede ser un tubo de recolección de sangre evacuado.

[0012] En este documento se describen kits que comprenden uno de los artículos de fabricación y un inserto de paquete.

25 [0013] En el presente documento se describen procedimientos para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente que comprende: mezclar una muestra de sangre recolectada de un sujeto con un almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente como se proporciona en este documento, en la que la una o más células permanecen metabólicamente activas a temperatura ambiente durante un período de al menos tres días. Al menos el 80 % de las células pueden permanecer metabólicamente activas a temperatura ambiente durante un período de al menos tres días. Las células pueden permanecer metabólicamente activas durante al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días o al menos 18 días. La célula puede permanecer metabólicamente activa a temperatura ambiente durante un período de al menos 18 días. La célula puede ser un leucocito, un eritrocito, una célula tumoral circulante o una combinación de los mismos. El sujeto puede ser un animal. El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto puede ser un humano. La muestra de sangre puede mezclarse con la formulación de estabilización en el momento en que se recoge la sangre del sujeto para estabilizar sustancialmente la una o más células metabólicamente activas.

35

Breve descripción de las figuras

[0014]

40 Las figuras 1A y 1B muestran gráficos de dispersión FACS de un estudio de 3 donantes que demuestran que las formulaciones y composiciones de la presente invención son capaces de estabilizar leucocitos CD45 positivos en una muestra de sangre a temperatura ambiente o a 4 °C después del almacenamiento durante 6 días. La figura 1A representa la estabilización a temperatura ambiente con formulaciones ejemplares frente a una muestra no protegida, y la figura 1B representa la estabilización a 4 °C con formulaciones ejemplares frente a una muestra no protegida.

45 Las figuras 2A y 2B proporcionan gráficos de barras que demuestran que las formulaciones y composiciones de la presente invención son capaces de estabilizar leucocitos totales positivos para CD45 y poblaciones de leucocitos viables que comprenden granulocitos, linfocitos y monocitos en una muestra de sangre después del almacenamiento durante 6 días a 4 °C frente a un muestra sin protección.

50 Las figuras 3A y 3B proporcionan gráficos de barras que demuestran que las formulaciones y composiciones de la presente invención son capaces de estabilizar poblaciones de leucocitos totales positivos para CD45 y poblaciones de leucocitos viables que comprenden granulocitos, linfocitos y monocitos en una muestra de sangre después del almacenamiento durante 6 días a temperatura ambiente frente a una muestra no protegida.

La figura 4 muestra un diagrama de dispersión FACS que demuestra que las formulaciones y composiciones de la presente invención son capaces de estabilizar poblaciones de monocitos en una muestra de sangre después del almacenamiento durante 5 días a 4 °C frente a una muestra no protegida.

La figura 5 muestra un gráfico de barras que demuestra que las formulaciones y composiciones de la presente invención son capaces de estabilizar células T /linfocitos positivos para CD4 y CD8 en una muestra de sangre después del almacenamiento durante 5 días a temperatura ambiente frente a una muestra no protegida.

5 La figura 6 muestra un diagrama de dispersión FACS que demuestra que las formulaciones y composiciones de la presente invención son capaces de estabilizar poblaciones de granulocitos CD66b-positivas viables en una muestra de sangre después del almacenamiento durante 8 horas a temperatura ambiente frente a una muestra no protegida.

Descripción detallada de la invención

10 [0015] La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. Se proporcionan formulaciones, composiciones, artículos de fabricación, kits y procedimientos para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente. En un aspecto, las formulaciones descritas en el presente documento mantienen de manera beneficiosa la integridad de células sanguíneas viables, metabólicamente activas e intactas de tamaño y forma similares a las encontradas en sangre entera, por ejemplo, leucocitos, eritrocitos y células tumorales circulantes. Estas células viables pueden analizarse ventajosamente mediante citometría de flujo o análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando anticuerpos generados contra proteínas de membrana de tipo salvaje nativas, receptores y proteínas de la superficie celular que no son posibles usando otras formulaciones de almacenamiento que desnaturalizan estas proteínas de la superficie celular.

20 [0016] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

25 [0017] Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias al "procedimiento" incluyen uno o más procedimientos, y/o pasos del tipo descrito en el presente documento que resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer esta divulgación y así sucesivamente.

[0018] "Aproximadamente", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, o $\pm 5\%$, o incluso $\pm 1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para las composiciones divulgadas o para realizar los procedimientos divulgados.

30 **Formulaciones y composiciones para estabilizar una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperaturas ambiente**

35 [0019] En un aspecto de la presente divulgación, se proporcionan formulaciones para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas, por ejemplo, un leucocito, un eritrocito y/o una célula tumoral circulante en una muestra de sangre a temperatura ambiente. La célula puede permanecer metabólicamente activa a temperatura ambiente durante un período de al menos tres días. Las células pueden permanecer metabólicamente activas durante al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días o al menos 18 días.

40 [0020] El término "temperatura ambiente", como se usa en el presente documento, se refiere a temperaturas ambiente comunes en interiores. La temperatura ambiente puede ser de 15 a 32 °C. La temperatura ambiente puede ser de 20 a 27 °C.

45 [0021] Las formulaciones para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre pueden comprender: un tampón de pH; un agente quelante; y un péptido. El péptido puede ser un di o tripéptido. El dipéptido puede ser alanina-glutamina. El dipéptido puede ser glicina-glicina. El tripéptido puede ser glicina-glicina-glicina. Otras formulaciones pueden comprender: un tampón de pH; un inhibidor de fosfatasa; y una purina. La purina puede ser adenina o guanina. Estas formulaciones pueden comprender además un agente quelante y al menos uno de un compuesto catiónico, compuesto zwitteriónico o un péptido. La formulación puede comprender además un tampón de acetato, sucralosa, glucosa, cloruro de potasio, mioinositol, N-metilglucamina, cloruro de magnesio o una combinación de los mismos.

50 [0022] En otro aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden una muestra de sangre mezclada con una formulación de estabilización como se proporciona en este documento para producir leucocitos, eritrocitos o células tumorales circulantes sustancialmente estables en una preparación de sangre entera. En otros aspectos, se proporciona una composición que comprende leucocitos aislados o purificados, eritrocitos o células tumorales circulantes mezcladas con la formulación de estabilización.

55 **Reactivos de formulación**

A. Tampones de pH

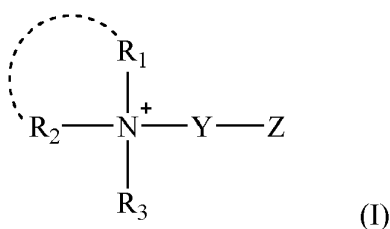
[0023] Las formulaciones y composiciones descritas en este documento para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células en una muestra de sangre incluyen uno o más tampones de pH como se define en las reivindicaciones. El tampón de pH puede ser cualquiera de una gran cantidad de compuestos conocidos en la técnica por su capacidad para resistir los cambios en el pH de una solución, como una solución acuosa, en la que está presente el tampón de pH. La selección de uno o más tampones de pH particulares para su inclusión en una composición de almacenamiento estable se puede hacer en base a la presente divulgación y de acuerdo con las prácticas habituales en la técnica, y puede estar influenciada por una variedad de factores que incluyen el pH que es deseable mantener, la naturaleza de la muestra por estabilizar, las condiciones del disolvente por emplear, los otros componentes de la formulación por utilizar y otros criterios. Por ejemplo, típicamente se utiliza 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 unidades de pH de una constante de disociación de protones (pKa) que es una característica del tampón.

[0024] Ejemplos no limitantes 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-hidroxietil)-1-piperazinopropanosulfónico), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-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(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico), TAPSO (ácido 2-hidroxi-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propanosulfónico), TES (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico), bicina (N,N-bis(2-hidroxietil)glicina), tricina (N-[tris(hidroximetil)metil]glicina), tris (tris(hidroximetil)aminometano) y bis-tris (2-[bis(2-hidroxietil)amino]-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol). Ciertos ejemplos contemplados en el presente documento, que incluyen varios de los expuestos en la Tabla 2, presentan una formulación que tiene 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. Compuestos catiónicos y compuestos zwitteriónicos

[0025] La formulación contiene un compuesto catiónico y un compuesto zwitteriónico como se define en las reivindicaciones. El compuesto zwitteriónico puede ser una sal interna cuaternaria. La formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células en una muestra de sangre a temperatura ambiente, incluidas las establecidas en la Tabla 2, la sal interna cuaternaria puede ser N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)-3-amonio-propionato o N-etil-piperidinio-4-butilsulfonato. En algunas realizaciones, la sal cuaternaria es N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)-3-amonio-propionato o N-etil-piperidinio-4-butilsulfonato, y está presente en concentraciones de aproximadamente 1,0-100 mg/ml, o 1,0-50 mg/ml, o aproximadamente 10,0-50 mg/ml. La sal interna cuaternaria puede ser una o más de las descritas en el documento WO 2012/018638.

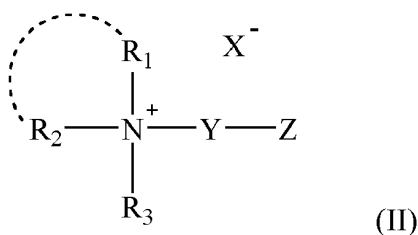
[0026] En algunas realizaciones, el compuesto zwitteriónico es un compuesto de fórmula (I):



en la que R1, R2 y R3 se seleccionan independientemente de alquilo no sustituido o sustituido, arilo no sustituido o sustituido, arilalquilo no sustituido o sustituido, o R1 y R2 forman opcionalmente un anillo, Y es CH₂, CH(A), CH(A)-CH(A), CH(A)-CH(A)-CH(A), en el que A es un alquilo, arilo, arilalquilo o cualquier cadena lateral no sustituida o sustituida que se encuentra típicamente en uno de los 20 aminoácidos naturales; y Z es CO₂⁻, SO₃⁻ u OPO₃⁻. En algunas realizaciones, R1 y R2 forman un anillo de morfolino, un anillo de pirrolidinio, un anillo de piperidinio o un anillo de oxazinio.

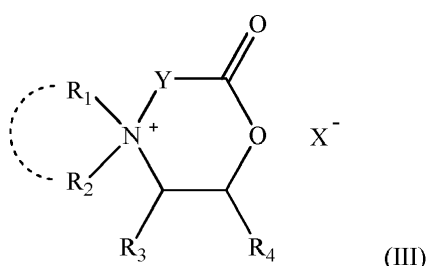
[0027] En algunas realizaciones, el compuesto catiónico se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un compuesto de fórmula (II):



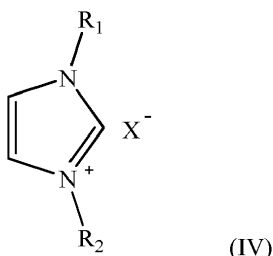
en la que R1, R2 y R3 se seleccionan independientemente de alquilo no sustituido o sustituido, arilo no sustituido o sustituido, arilalquilo no sustituido o sustituido, o R1 y R2 forman opcionalmente un anillo, Y es CH₂, CH(A), CH(A)-CH(A), CH(A)-CH(A)-CH(A), la que A es un alquilo, arilo, arilalquilo no sustituido o sustituido o cualquier cadena lateral que se encuentra típicamente en uno de los 20 aminoácidos naturales; Z es CO₂A; y X es un anión farmacéuticamente aceptable;

b) un compuesto de fórmula (III):



en la que R1, R2, R3 y R4 se seleccionan independientemente de alquilo no sustituido o sustituido, arilo no sustituido o sustituido, arilalquilo no sustituido o sustituido, o R1 y R2 forman opcionalmente un anillo, Y es CH₂, CH(A), CH(A)-CH(A), CH(A)-CH(A)-CH(A), la que A es un alquilo, arilo, arilalquilo no sustituido o sustituido o cualquier cadena lateral que se encuentra típicamente en uno de los 20 aminoácidos naturales; y X es un anión farmacéuticamente aceptable; y

(c) un compuesto de fórmula (IV):



en la que R1 y R2 se seleccionan independientemente de alquilo no sustituido o sustituido, arilo no sustituido o sustituido, arilalquilo no sustituido o sustituido; y X es un anión farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, R1 y R2 de un compuesto de fórmula (II) o fórmula (III) forman un anillo de morfolino, anillo de pirrolidinio, un anillo de piperidinio o un anillo de oxazinio.

[0028] Un grupo "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado alifático. La fracción alquilo incluye un grupo "alquilo saturado", lo que significa que no contiene ninguna fracción alqueno o alquino. La fracción alquilo también incluye una fracción "alquilo insaturado", lo que significa que contiene al menos una fracción alqueno o alquino. Una fracción "alqueno" se refiere a un grupo que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, y una fracción "alquino" se refiere a un grupo que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. La fracción alquilo, ya sea saturado o insaturado, incluye fracciones ramificadas, de cadena lineal o cíclicas. Dependiendo de la estructura, un grupo alquilo incluye un monorrádical o un dirradical (es decir, un grupo alquilenilo), y si es un "alquilo inferior" que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Como se usa en este documento, C1-Cx incluye C1-C2, C1-C3 ... C1-Cx. La fracción "alquilo" opcionalmente tiene de 1 a 10 átomos de carbono (siempre que aparezca en este documento, un rango numérico como "1 a 10" se refiere a cada número entero en el rango dado; por ejemplo, "1 a 10 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo se selecciona de una fracción que tiene 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta 10 átomos de carbono inclusive, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquilo" en el que no se designa ningún rango numérico) El grupo alquilo de los compuestos descritos en el presente documento puede designarse como "alquilo C1-C4" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquilo C1-C4" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena alquilo, es decir, la cadena alquilo se selecciona entre metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo y t-butilo. Así, el alquilo C1-C4 incluye

alquilo C1-C2 y alquilo C1-C3. Los grupos alquilo están opcionalmente sustituidos o no sustituidos. Los grupos alquilo típicos incluyen, entre otros, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo, etenilo, propenilo, butenilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares.

5 [0029] Como se usa en el presente documento, el término "anillo" se refiere a cualquier estructura cerrada covalentemente. Los anillos incluyen, por ejemplo, carbociclos (por ejemplo, arilos y cicloalquilos), heterociclos (por ejemplo, heteroarilos y heterociclos no aromáticos), aromáticos (por ejemplo, arilos y heteroarilos) y no aromáticos (por ejemplo, cicloalquilos y heterociclos no aromáticos). Los anillos pueden estar opcionalmente sustituidos. Los anillos pueden ser monocíclicos o policíclicos.

10 [0030] El término "arilo" usado solo o como parte de una fracción mayor como en "arilalquilo", "arilalcoxi" o "ariloxialquilo", se refiere a un sistema de anillo de carbono monocíclico, bicíclico o tricíclico, que incluye anillos fusionados, en el que al menos un anillo en el sistema es aromático. El término "arilo" puede usarse indistintamente con el término "anillo de arilo". En una realización, arilo incluye grupos que tienen 6-12 átomos de carbono. En otra realización, arilo incluye grupos que tienen 6-10 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, antracilo, fenantrenilo, naftacenilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftalenilo, 1H-indenilo, 2,3-dihidro-1H-indenilo y similares.
15 Un arilo particular es fenilo. En otra realización, arilo incluye indanilo, naftilo y tetrahidronaftilo, y similares, donde el radical o punto de unión está en un anillo aromático.

20 [0031] El término "opcionalmente sustituido" o "sustituido" significa que el grupo al que se hace referencia puede estar sustituido con uno o más grupos adicionales seleccionados individual e independientemente de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, alquilsulfóxido, arilsulfóxido, alquilsulfona, arilsulfona, ciano, halo, acilo, nitro, haloalquilo, fluoroalquilo, amino, incluidos grupos amino mono y disustituidos, y los derivados protegidos de los mismos. A modo de ejemplo, un sustituyente opcional puede ser LsRs, en el que cada Ls se selecciona independientemente de un enlace, -O-, -C(=O)-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)₂-, -NH-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, S(=O)₂NH-, -NHS(=O)₂-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -(alquilo C1-C6 sustituido o no sustituido), o -(alqueno C2-C6 sustituido o no sustituido); y cada Rs se selecciona independientemente de H, (alquilo C1-C4 sustituido o no sustituido), (cicloalquilo C3-C6 sustituido o no sustituido), heteroarilo o heteroalquilo.
25

[0032] En los ejemplos de las formulaciones descritas en el presente documento, incluidas las establecidas en la Tabla 2, el compuesto catiónico puede seleccionarse de uno de los compuestos catiónicos ejemplares de la Tabla 1. En los ejemplos de las formulaciones descritas en el presente documento, incluidas las establecidas en la Tabla 2, el compuesto zwitteriónico puede seleccionarse de uno de los ejemplos de compuestos zwitteriónicos de la Tabla 1.

30 TABLA 1. Compuestos catiónicos y zwitteriónicos ejemplares para estabilizar células en una muestra de sangre a temperaturas ambiente

D201	Bromuro de 4-(2-etoxi-2-oxoetil)-4-etilmorfolin-4-io	Compuesto catiónico
D202	Bromuro de N-(2-etoxi-2-oxoetil)-3-hidroxi-N,N-bis(2-hidroxi-etil)propan-1-aminio	Compuesto catiónico
D203	Bromuro de 2-etoxi-N,N,N-trietil-2-oxoetanaminio	Compuesto catiónico
D204	Acetato de 2-((3-hidroxi-propil)dimetilamonio)	Zwitterión
D205	Acetato de 2-((2-hidroxi-propil)dimetilamonio)	Zwitterión
D206	Acetato de 2-(2-(hidroximetil)-1-metilpiperidinio-1-il)	Zwitterión
D207	Acetato de 2-((2-hidroxi-etil)dimetilamonio)	Zwitterión
D208	Acetato de 2-((2,3-dihidroxi-propil)dimetilamonio)	Zwitterión
D209	Bromuro de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-4-hidroxi-1-metilpiperidinio	Compuesto catiónico
D210	Acetato de 2-(4-hidroxi-1-metilpiperidinio-1-il)	Zwitterión
D211	Bromuro de 2-etoxi-N-(2-(2-hidroxi-etoxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio	Compuesto catiónico

ES 2 812 201 T3

(continuación)

D212	Acetato de 2-((2-(2-hidroxi)etilo)dimetilamonio)	Zwitterión
D213	Bromuro de 4-(2-hidroxi)etil-4-metil-2-oxomorfolin-4-ilo	Compuesto catiónico
D214	Acetato de 2-(bis(2-hidroxi)etil)-(metil)amonio	Zwitterión
D215	Acetato de 2-(4-(2-hidroxi)etil)morfolino-4-ilo	Zwitterión
D216	Acetato de 2-(4-(2-hidroxi)etil)morfolino-4-ilo	Zwitterión
D217	Bromuro de 4-(2-etoxi-2-oxoetil)-4-metilmorfolin-4-ilo	Compuesto catiónico
D218	Bromuro de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1-metilpirrolidinio	Compuesto catiónico
D219	Acetato de 2-(bencil(2-hidroxi)etil)(metil)amonio	Zwitterión
D220	Cloruro de 3-(2,3-dihidroxi)propil-1-metil-1H-imidazol-3-ilo	Compuesto catiónico
D221	Sulfato de 1,3-dimetil-1H-imidazol-3-ilo metil	Compuesto catiónico
D222	Bromuro de 3-(2-etoxi-2-oxoetil)-1-metil-1H-imidazol-3-ilo	Compuesto catiónico
D223	Acetato de 2-(1-(2-hidroxi)etil)pirrolidinio-1-ilo	Zwitterión
D224	Bromuro de N-benzil-2-etoxi-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio	Compuesto catiónico
D225	Bromuro de 2-etoxi-N,N-dietil-N-metil-2-oxoetanaminio	Compuesto catiónico
D226	Bromuro de N-(2-etoxi-2-oxoetil)-N,N-dimetilbutan-1-aminio	Compuesto catiónico
D227	Bromuro de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1-metilpiperidinio	Compuesto catiónico
D228	Bromuro de N-(2-etoxi-2-oxoetil)-N,N-dimetilbencenaminio	Compuesto catiónico
D229	Bromuro de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-3-hidroxi-1-metilpiperidinio	Compuesto catiónico
D230	Cloruro de 3-(2-(2-hidroxi)etilo)etil-1-metil-1H-imidazol-3-ilo	Compuesto catiónico
D231	Cloruro de 3-(2-(2-(2-hidroxi)etilo)etoxi)etil-1-metil-1H-imidazol-3-ilo	Compuesto catiónico
D232	Bromuro de 1-metil-3-tetradecil-1H-imidazol-3-ilo	Compuesto catiónico
D233	Bromuro de N-(2-etoxi-2-oxoetil)-N,N-dimetilciclohexanaminio	Compuesto catiónico
D234	3-((2-hidroxi)etil)dimetil-amonio)propanoato	Zwitterión

C. Péptidos

5 [0033] Las formulaciones descritas en este documento para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente contienen un péptido como se

define en las reivindicaciones. Ventajosamente, se ha determinado que las formulaciones, incluidas las expuestas en la Tabla 2, que comprenden una cantidad estabilizante de un pequeño di- o tripéptido, por ejemplo, 50 mM o 200 mM, en presencia de un tampón de pH son inesperadamente capaces de estabilizar sustancialmente las células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente y durante un período de tiempo que excede el almacenamiento en frío de estas células. El dipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos aa-aa, en la que aa es cualquiera de los 20 aminoácidos naturales o no naturales. En algunas realizaciones, el dipéptido es alanina-glutamina. En algunas realizaciones, el dipéptido es glicina-glicina. El tripéptido puede tener la secuencia de aminoácidos aa-aa-aa, en la que aa es cualquiera de los 20 aminoácidos naturales o no naturales. En algunas realizaciones, el tripéptido es glicina-glicina-glicina.

10 D. Inhibidores de fosfatasa

[0034] Las formulaciones descritas en este documento para el almacenamiento estable sustancial de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente pueden, en ciertos ejemplos, contener un inhibidor de fosfatasa. El inhibidor de fosfatasa puede ser un inhibidor de la clase de fosfatasas serina-treonina. El inhibidor de fosfatasa puede ser fosfato de 2-glicerol. El inhibidor de fosfatasa puede estar presente a una concentración de aproximadamente 1,0-100 mM, o aproximadamente 25-75 mM, o aproximadamente 50 mM. El inhibidor de la fosfatasa puede ser fosfato de 2-glicerol, y puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1,0-100 mM, o aproximadamente 25-75 mM, o aproximadamente 50 mM.

15 E. Agentes quelantes

[0035] Los agentes quelantes o de quelatación están incluidos, de acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones, en la composición descrita presente para el almacenamiento sustancialmente estable de células intactas viables en una muestra de sangre. Dichos agentes quelantes son conocidos por aquellos familiarizados con la técnica por su capacidad para formar complejos y dificultar la reactividad de los cationes metálicos. Agentes quelantes ejemplares incluyen ácido dietilentiainopentaacético (DTPA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético (CDTA), ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido N-(2-hidroxi)etil)etilendiamina-N,N',N'-triacético, gluconato de sodio y ácido nitrilotriacético (NTA). En algunas realizaciones, el agente quelante es gluconato de sodio y está presente a una concentración de aproximadamente 1,0-50 mM, o aproximadamente 10-40 mM, o aproximadamente 25 mM.

30 F. Purinas

[0036] Se puede incluir una purina en la composición descrita presente para el almacenamiento sustancialmente estable de células intactas viables en una muestra de sangre. La purina puede ser adenina, guanina o ambas. La purina puede ser adenina. La purina puede ser guanina.

35 **Formulaciones ejemplares para la estabilización de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperaturas ambiente**

[0037] Se proporcionan formulaciones para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente. La formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre puede comprender: un tampón de pH; un agente quelante; y un péptido. La formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre puede comprender: un tampón de pH; un agente quelante; y un di o tripéptido. La formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre puede comprender: un tampón de pH; un agente quelante; y un dipéptido de alanina-glutamina, un dipéptido de glicina-glicina o un tripéptido de glicina-glicina-glicina. La formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre puede comprender: un tampón de pH; un inhibidor de fosfatasa; y una purina. El inhibidor de fosfatasa puede ser un inhibidor de serina-treonina fosfatasa, la purina puede ser adenina o guanina. El inhibidor de la fosfatasa puede ser fosfato de 2-glicerol y la purina puede ser adenina. En otros ejemplos, las formulaciones pueden comprender, además: un agente quelante; y al menos uno de un compuesto catiónico, un compuesto zwitteriónico o un péptido. En otros ejemplos, las formulaciones pueden comprender además un gluconato de sodio y al menos uno de un compuesto catiónico, compuesto zwitteriónico o un péptido. En algunos ejemplos, la formulación puede comprender además un tampón de acetato, sucralosa, glucosa, cloruro de potasio, mioinositol, N-metilglucamina, cloruro de magnesio o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el compuesto zwitteriónico es una sal interna cuaternaria, y los péptidos son di o tripéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos Ala-Gln, Gly-Gly o Gly-Gly-Gly, respectivamente.

[0038] Las formulaciones ejemplares para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Formulaciones ejemplares para estabilizar una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperaturas ambiente			
Formulación No.	Composición	Formulación No.	Composición
1	Gly-Gly-Gly 200 mM, K2-EDTA 4,4 mM, MES 50 mM, pH 6,6	40	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-216 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 7,4
2	Gly-Gly 200 mM, K2-EDTA 4,4 mM, MOPS 50 mM, pH 6,9	41	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de glicerol 50 mM, D-217 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 7,4
3	Ala-Gln 200 mM, K2-EDTA 4,4 mM, MES 50 mM, pH 6,6	42	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-218 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 7,4
4	Ala-Gln 200 mM, K2-EDTA 4,4 mM, MOPS 50 mM, pH 6,9	43	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de glicerol 50 mM, D-219 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 7,4
5	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-201 100 mM	44	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-220 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 7,4
6	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-202 100 mM	45	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de glicerol 50 mM, Ala-Gln 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM pH 7,4
7	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-203 100 mM	46	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de glicerol 50 mM, Ala-Gln 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM pH 7,4
8	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-204 100 mM	47	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de glicerol 50 mM, Ala-Gln 65 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM pH 7,4
9	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-205 100 mM	48	MOPS 25 mM, sal disódica de fosfato de glicerol 25 mM, Ala-Gln 65 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,4
10	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-206 100 mM	49	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-221 25 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,4

ES 2 812 201 T3

(continuación)

Formulaciones ejemplares para estabilizar una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperaturas ambiente			
Formulación No.	Composición	Formulación No.	Composición
11	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-207 100 mM	50	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de glicerol 25 mM, D-222 25 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,4
12	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-208 100 mM	51	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-223 25 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,5
13	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-209 100 mM	52	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-224 25 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,5
14	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-210 100 mM	53	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-225 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6
15	MES 50 mM, 50 mM sal disódica de fosfato de 2-glicerol, K2-EDTA 4,4 mM, D-201 100 mM	54	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-226 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,5
	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-202 100 mM		MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-227 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6
17	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-203 100 mM	56	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-228 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6
18	MES 50 mM, 50 mM sal disódica de fosfato de 2-glicerol, K2-EDTA 4,4 mM, 100 mM D-204	57	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-229 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,4
19	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-205 100 mM	58	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-230 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 25 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 25 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6
20	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-206 100 mM	59	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-221 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6

ES 2 812 201 T3

(continuación)

Formulaciones ejemplares para estabilizar una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperaturas ambiente			
Formulación No.	Composición	Formulación No.	Composición
21	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-207 100 mM	60	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-222 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,4
22	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-208 100 mM	61	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-223 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,0
23	MES 50 mM, 50 mM sal disódica de fosfato de 2-glicerol, K2-EDTA 4,4 mM, 100 mM D-209	62	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-224 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,5
24	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-210 100 mM	63	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-225 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,2
25	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-211 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	64	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-226 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,2
26	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-212 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	65	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-227 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,3
27	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-213 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	66	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-228 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,0
28	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-214 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	67	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-229 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6
29	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-215 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	68	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-230 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,4
30	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-216 100 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	69	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, mioinositol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6

(continuación)

Formulaciones ejemplares para estabilizar una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperaturas ambiente			
Formulación No.	Composición	Formulación No.	Composición
31	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-217 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	70	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, Gly-Gly-Gly 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6
32	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-218 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	71	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, Ala-Gln 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6
33	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-219 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	72	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, N-metilglucamina 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,6
34	MES 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-220 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 6,6	73	MOPSO 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 15 mM, D-219 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, NaOAc 20 mM, KCl 5 mM, gluconato de sodio 20 mM, MgCl ₂ 3 mM, pH 7,4
35	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de glicerol 50 mM, D-211 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 7,4	74	MES 50 mM, 200 mM Ala-Gln, Sucralosa 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, pH 6,9
36	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-212 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 7,4	75	MOPS 50 mM, Ala-Gln 200 mM, Sucralosa 25 mM, K2-EDTA 4,4 mM, pH 7,2
37	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, D-213 50 mM, adenina 2 mM, pH 7,4	76	MES 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-219 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 5 mM, sucralosa 25 mM, glucosa 25 mM, Ala-Gln 25 mM, pH 6,9
38	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-214 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 7,4	77	MES 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, D-219 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 5 mM, sucralosa 50 mM, glucosa 25 mM, Ala-Gln 50 mM, KCl 5 mM, pH 6,9
39	MOPS 50 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 50 mM, D-215 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 2 mM, pH 7,4		

Procedimientos para preparar formulaciones para estabilizar leucocitos, eritrocitos y células tumorales circulantes a temperaturas ambiente

[0039] Los procedimientos para preparar las formulaciones descritas en este documento para el almacenamiento sustancialmente estable de una célula metabólicamente activa en una muestra de sangre a temperatura ambiente emplean técnicas que son bien conocidas por los expertos en el arte y generalmente usan reactivos disponibles comercialmente. Las formulaciones pueden prepararse como soluciones madre concentradas de los reactivos de formulación, por ejemplo, 2X, 5X, 10X, 20X o similares, para mezclarlas con la muestra de sangre en las proporciones apropiadas para formar las concentraciones deseadas. Los compuestos catiónicos y los compuestos zwitteriónicos descritos en la Tabla 1 pueden sintetizarse y formularse como se describió previamente, por ejemplo, véase el documento WO 20120186638.

Células purificadas

[0040] La una o más células metabólicamente activas sustancialmente estables pueden purificarse de la muestra de sangre usando procedimientos convencionales bien conocidos empleados habitualmente por los expertos en la materia. Se conocen aparatos, kits y procedimientos para purificar células sanguíneas de la sangre. Por ejemplo, se han aplicado varios principios para separar los eritrocitos de varias poblaciones de leucocitos. Tradicionalmente, se han utilizado separaciones por gradiente. Las separaciones por gradiente funcionan según el principio de que los eritrocitos son pequeños y densos, y pueden formar un gránulo cuando se centrifugan, generalmente debajo de un "colchón" de una sustancia como Ficoll. Aunque son efectivos, los procedimientos de gradiente son típicamente lentos, difíciles de automatizar, no reproducibles, dan bajos rendimientos y producen células con poca viabilidad. Además, el producto final a menudo contiene contaminación restante de eritrocitos, lo que requiere pasos de procesamiento adicionales (por ejemplo, lisis de eritrocitos) para eliminar las células separadas de manera inadecuada.

[0041] Otro procedimiento comúnmente usado para separar la sangre para ensayos funcionales y diagnósticos clínicos es la lisis directa de glóbulos rojos. El principio de este procedimiento es que los glóbulos rojos son más sensibles a los cambios en la osmolaridad de los medios que los glóbulos blancos, de modo que un cambio breve y rápido en la osmolaridad del medio o tampón producirá lisis en más glóbulos rojos que en glóbulos blancos. De hecho, los procedimientos de lisis funcionan, pero al igual que con los procedimientos de gradiente, la reproducibilidad de la separación y la viabilidad y el número de células WBC restantes son típicamente pobres y no representativos de toda la población. El daño a los WBC también puede ocurrir con estos procedimientos de lisis.

[0042] Una tecnología desarrollada más recientemente para separar subpoblaciones de células sanguíneas ha utilizado partículas magnéticas para separar células sanguíneas. Alternativamente, las células viables metabólicamente activas, intactas y sustancialmente estabilizadas se purifican por cromatografía de afinidad, citometría de flujo o por análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando anticuerpos generados contra proteínas y receptores de membrana de tipo salvaje nativos, lo que no es posible usando condiciones de formulación de almacenamiento que desnaturalizan estas proteínas celulares. Las células tumorales circulantes pueden aislarse usando anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales particulares expresados en la superficie celular para capturar poblaciones de células tumorales circulantes o pueden usarse anticuerpos específicos para seleccionar subpoblaciones específicas dependiendo del análisis por realizar y los patrones de expresión de células tumorales circulantes. La determinación de los patrones de expresión de antígeno y la selección de anticuerpos está dentro del alcance de un experto en la materia.

[0043] La una o más células metabólicamente activas purificadas pueden almacenarse posteriormente en las formulaciones descritas en el presente documento durante períodos prolongados antes del análisis.

Artículos de fabricación

[0044] Se pueden proporcionar artículos de fabricación en los que una de las formulaciones descritas en el presente documento, incluidas las establecidas en la Tabla 2, están contenidas dentro de un tubo, contenedor o recipiente de recolección de sangre adecuado. Estos artículos de fabricación pueden usarse para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas mediante la estabilización de una o más células en el momento de la extracción de sangre. El tubo de recolección de sangre es un tubo de sangre evacuado que tiene menos de la presión atmosférica para extraer un volumen predeterminado de sangre entera. Estos artículos de fabricación pueden usarse en los kits y procedimientos descritos en este documento.

Kits

[0045] En el presente documento se describen kits que comprenden cualquiera de los artículos de fabricación que comprenden las formulaciones de la presente invención, incluidos los de la Tabla 2, y un inserto de embalaje. Los componentes del kit pueden suministrarse en un contenedor, como una caja de plástico compartimentada. El contenedor puede tener una tapa herméticamente sellable para que el contenido del kit pueda esterilizarse y sellarse para su almacenamiento para su uso posterior.

Procedimientos para almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperaturas ambiente

[0046] Se proporcionan procedimientos para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente.

5 [0047] Los procedimientos comprenden mezclar una muestra de sangre con las formulaciones descritas en este documento para el almacenamiento sustancialmente estable de células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente, en la que la célula o al menos el 80 % de las células permanecen metabólicamente activas a temperatura ambiente durante un período de al menos tres días. La célula o células permanecen metabólicamente activas durante al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días o al menos 18 días.

10 [0048] La formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas, por ejemplo, un leucocito, un eritrocito y/o una célula tumoral circulante, en una muestra de sangre a temperatura ambiente puede comprender: un tampón de pH; un agente quelante; y un péptido. El péptido puede ser un di o tripéptido. El péptido puede ser un dipéptido alanina-glutamina, un dipéptido de glicina-glicina o un tripéptido de glicina-glicina-glicina. La formulación para el almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente
15 activas en una muestra de sangre puede comprender: un tampón de pH; un inhibidor de fosfatasa; y una purina. La purina puede ser adenina o guanina. Las formulaciones pueden comprender además un agente quelante y al menos uno de un compuesto catiónico, compuesto zwitteriónico o un péptido, y aún pueden comprender además un tampón de acetato, sucralosa, glucosa, cloruro de potasio, mioinositol, N-metilglucamina, cloruro de magnesio, o una combinación de los mismos. Las formulaciones pueden comprender además un agente quelante y al menos uno de
20 un compuesto catiónico, compuesto zwitteriónico o un péptido, y aún más comprender un tampón de acetato, sucralosa, glucosa, cloruro de potasio, mioinositol, N-metilglucamina, cloruro de magnesio o una combinación de los mismos. La formulación puede ser una de las formulaciones expuestas en la Tabla 2.

[0049] Los tubos, bolsas, contenedores y vasos de recolección de sangre son bien conocidos en la técnica y han sido empleados por médicos durante décadas. La sangre recolectada para el almacenamiento sustancialmente estable de
25 una o más células metabólicamente activas puede obtenerse usando cualquier procedimiento o aparato comúnmente empleado por los expertos en la técnica, como la punción venosa o la punción digital. Cuando la sangre se recoge por punción venosa, la formulación puede ubicarse dentro del tubo de recolección de sangre, por ejemplo, un tubo evacuado (tubo de recolección de sangre VACUTAINER, Becton Dickenson o tubo de recolección de sangre VACUETTE, Greiner Bio-One) en el momento de la muestra de sangre se obtiene del sujeto. Cuando la sangre se
30 recoge por punción venosa, las formulaciones se pueden agregar a una muestra de sangre entera ya obtenida, ya sea inmediatamente o poco después de que se extraiga.

[0050] Los procedimientos descritos en este documento pueden usar los artículos de fabricación y los kits descritos en este documento.

[0051] Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración y no de limitación.

35 **Ejemplo 1**

Estabilización de leucocitos y eritrocitos intactos, metabólicamente activos en muestras de sangre humana por al menos 18 días a temperaturas ambiente

[0052] Este ejemplo describe formulaciones y composiciones para estabilizar leucocitos y/o eritrocitos en una muestra de sangre durante un período de al menos 18 días a temperatura ambiente.

40 [0053] Se recogió sangre humana completa de un donante consintiente en tubos K2-EDTA de Greiner Bio-One (Cat #455045). Se colocaron 1,5 ml de cada formulación en tubos Vacuette vacíos de 3 ml de Greiner Bio-One. La sangre se reunió en un único contenedor, se mezcló y se distribuyó a cada uno de los tubos, mezclándose después de cada 10 partes alícuotas de sangre a los tubos. Los tubos se taparon y se mezclaron 10-12 veces por inversión. Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente en un laboratorio a 75°F (23,9 °C). Se prepararon tubos por duplicado para
45 cada formulación y se prepararon adicionalmente dos tubos tanto para el control de temperatura ambiente como para el control a 4°C, respectivamente. Los controles se prepararon con 3 ml de sangre cada uno para obtener limpiamente el plasma de alícuotas de muestra. Después de 4 días, la sangre no tratada se sometió a lisis congelando y descongelando la sangre dos veces y luego diluyendo la sangre 1:1 para tener en cuenta la adición del estabilizador a cada muestra. La sangre se diluyó en serie 10 veces para dar un control de hemólisis al 10 % y luego se diluyó otras
50 5 veces para dar un control de hemólisis al 2 %. El control de hemólisis al 2 % se diluyó secuencialmente 1:1 para dar diluciones adicionales de 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 y 0,015625. Se transfirieron partes alícuotas de 200 microlitros de las diluciones a una placa de microtitulación UV-Star de 96 pozos (Greiner Bio-One) y se tomaron medidas a 415 nm utilizando un instrumento Biotek Synergy 2 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores por ciento de hemólisis se representaron frente a la DO a 415 nm y se usaron para calcular la línea de regresión
55 a través de los puntos. La ecuación que define la línea de regresión calculada se obtuvo mediante el uso de Excel y esta línea se usó para calcular el valor por ciento de hemólisis para un subconjunto de formulaciones analizadas de la Tabla 2 que se probaron a los 4, 10 y 18 días.

TABLA 3. Línea de regresión de determinación del valor porciento de hemólisis para muestras de control

% Hemólisis	#1	#2	Promedio	% Hemólisis
1	6,177	6,324	6,2505	1
0,5	3,118	3,234	3,176	0,5
0,25	1,637	1,632	1,6345	0,25
0,125	0,816	0,829	0,8225	0,125
0,0625	0,404	0,415	0,4095	0,0625
0,03125	0,209	0,211	0,21	0,03125
0,015625	0,11	0,119	0,1145	0,015625

[0054] La línea de regresión resultante se calculó a partir de estos datos para lograr $y = 0,1603x - 0,0055$ y un valor R^2 igual a 0,9999.

5 [0055] La preparación de la muestra en cada condición y punto de tiempo incluyó la extracción de alícuotas de 1 ml de cada tubo y la transferencia a un tubo de microcentrífuga Eppendorf de 1,5 ml. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417 y se transfirieron alícuotas de 250 microlitros de la capa de plasma de cada tubo y se diluyeron 1:1 en los puntos de tiempo de 4 días. Los puntos de tiempo posteriores para algunas formulaciones, incluidos los controles, requieren diluciones mayores para que la lectura no esté fuera de escala. Todas las mediciones se corrigieron con espacios en blanco y se corrigió la longitud de la ruta a través del software Gen 5 utilizado para controlar el lector de placas Biotek de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se promedió el valor porciento de hemólisis de los dos duplicados de lectura. La Tabla 4 presenta los valores para cada muestra duplicada (es decir, "#1" y "#2"), un valor promedio y por ciento de hemólisis observado en los días 4, 10 y 10 18 para cada formulación probada (números de formulación 1-24 de la Tabla 2).

TABLA 4. Estabilización de células en muestras de sangre almacenadas a temperatura ambiente durante cuatro, diez u dieciocho días usando formulaciones ejemplares de la tabla 2

Forma	4 Día #1	4 Día #2	Prom.	% de Hemólisis	10-Día #1	10 Día #2	Prom.	% de Hemólisis	18 Día #1	18 Día #2	Prom.	% de Hemólisis
NP@ RT	1,008	1,102	1,055	0,327	6,512	6,521	6,516	4,156	5,503	5,581	5,542	14,126
NP@ 4 °C	1,201	1,189	1,195	0,372	1,350	1,345	1,348	0,842	5,849	5,825	5,837	7,441
1	0,712	0,718	0,715	0,218	2,911	2,868	2,890	0,915	2,910	2,899	2,904	1,840
2	0,801	0,797	0,799	0,245	3,713	3,707	3,710	1,178	6,355	6,229	6,292	4,012
3	0,749	0,755	0,752	0,230	2,656	2,682	2,669	0,845	1,724	1,710	1,717	1,079
4	0,827	0,819	0,823	0,253	3,169	3,174	3,172	1,006	1,496	1,505	1,500	0,940
5	1,010	1,003	1,007	0,312	3,248	3,241	3,244	1,029	4,031	4,077	4,054	2,577
6	0,963	0,926	0,944	0,292	4,165	4,153	4,159	1,322	5,567	5,479	5,523	3,519
7	0,810	0,811	0,810	0,249	3,139	3,116	3,128	0,992	3,889	3,957	3,923	2,493
8	0,800	0,787	0,794	0,243	4,336	4,252	4,294	1,366	4,494	4,489	4,492	2,858
9	0,772	0,744	0,758	0,232	2,889	2,835	2,862	0,907	3,823	3,820	3,822	2,428
10	1,009	1,008	1,008	0,312	2,893	2,846	2,870	0,909	3,368	3,363	3,366	2,136
11	1,248	1,260	1,254	0,391	3,710	3,738	3,724	1,183	5,267	5,331	5,299	3,376
12	1,083	1,080	1,082	0,336	3,864	3,875	3,870	1,230	4,994	4,966	4,980	3,171
13	0,778	0,787	0,782	0,240	3,037	3,022	3,030	0,960	3,526	3,549	3,538	2,246
14	1,021	1,001	1,011	0,313	5,122	5,090	5,106	1,626	Sobreflujo	Sobreflujo		

(continuación)

Forma	4 Día #1	4 Día #2	Prom.	% de Hemólisis	10-Día #1	10 Día #2	Prom.	% de Hemólisis	18 Día #1	18 Día #2	Prom.	% de Hemólisis
15	0,710	0,709	0,710	0,216	2,665	2,627	2,646	0,837	3,399	3,316	3,358	2,131
16	0,799	0,808	0,804	0,247	3,896	3,953	3,924	1,247	4,445	4,439	4,442	2,826
17	1,022	1,030	1,026	0,318	3,107	3,055	3,081	0,977	2,856	2,895	2,876	1,822
18	1,049	1,040	1,044	0,324	3,601	3,633	3,617	1,149	4,729	4,724	4,726	3,009
19	1,013	1,026	1,020	0,316	2,749	2,795	2,772	0,878	3,805	3,786	3,796	2,412
20	0,886	0,869	0,878	0,270	1,413	1,412	1,412	0,442	2,936	2,959	2,948	1,868
21	1,032	1,038	1,035	0,321	1,590	1,589	1,590	0,499	3,092	3,069	3,080	1,953
22	1,002	0,972	0,987	0,306	2,298	2,309	2,304	0,728	6,723	6,350	6,536	4,169
23	0,714	0,713	0,714	0,218	1,196	1,170	1,183	0,368	4,282	4,280	4,281	2,723
24	0,820	0,796	0,808	0,248	1,889	1,877	1,883	0,593	4,014	4,014	4,014	2,552

[0056] Como se muestra en la Tabla 4, el subconjunto de las formulaciones ejemplares probadas para estabilizar leucocitos y eritrocitos evitó la hemólisis de los eritrocitos tan bien o mejor que las muestras almacenadas sin protección a 4°C durante el mismo período de tiempo de al menos 18 días.

5 Ejemplo 2

Estabilización de proteínas nativas de superficie celular expresadas en leucocitos en una muestra de sangre humana durante al menos seis días a temperaturas ambiente

10 [0057] Este ejemplo demostró que las formulaciones y composiciones estabilizaron leucocitos, linfocitos y granulocitos en una muestra de sangre a temperatura ambiente durante un período de hasta 6 días, como lo demuestra el análisis FACS usando anticuerpos dirigidos a marcadores de proteínas ejemplares nativos expresados en la superficie de varios leucocitos, CD45, CD4, CD8 y CD66b.

A. Leucocitos CD45 positivos

[0058] El marcador específico de leucocitos, CD45, se usó para evaluar la estabilidad relativa de la población de leucocitos en composiciones de sangre entera que comprenden formulaciones de la presente invención.

15 [0059] Se mezcló sangre humana completa recogida en tubos de VACUETTE K2-EDTA en una relación 1:1 de sangre entera con reserva 1X de las formulaciones 33, 74, 75, 76 o 77 de la Tabla 2. Las muestras de control se almacenaron a temperatura ambiente (RT) y 4 °C. A los 0, 3 y 6 días después del almacenamiento a temperatura ambiente, las muestras experimentales y de control se recuperaron del almacenamiento y se marcaron usando un anticuerpo conjugado con CD45 FITC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los eritrocitos se eliminaron tratando las
20 muestras de sangre con solución de lisis BD FACS (Cat# 216667-08-2) o un tampón de lisis genérico no fijador durante 10 minutos antes de 2 lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X. Las células restantes, predominantemente leucocitos, se suspendieron en 1X PBS y se analizaron en el citómetro de flujo BD ACCURI a 100.000 eventos/muestra y un ajuste de caudal medio. Se agregaron perlas de recuento COUNTBRIGHT (Life Technologies Cat# C36950) según las instrucciones del fabricante para obtener un recuento de células preciso. Se
25 agregó BD VIA-PROBE (Cat# 555816) según las instrucciones del fabricante para evaluar la viabilidad. Los datos fueron adquiridos y analizados para evaluar la dispersión lateral versus fluorescencia CD45-FITC/FL-1.

[0060] La figura 1A muestra los datos de citometría de flujo de las muestras de control a los 0 y 6 días después del almacenamiento a temperatura ambiente. En las muestras de control, la población de granulocitos se separó en dos poblaciones distintas, una con fluorescencia CD45 más alta y otra con CD45 más baja. En los controles no protegidos,
30 la granularidad en la población de granulocitos cambió, lo que fue indicado por la reducción en el SSC. Hubo pocos cambios en la granularidad y no hubo separación de las poblaciones de granulocitos en las formulaciones 74 y 76 en el día 6 posterior a la recolección. Las poblaciones de granulocitos en las formulaciones 74 y 76 requirieron solo un ligero ajuste de compuerta entre los días 0 y el día 6, mientras que los controles desprotegidos requirieron grandes cambios de compuerta. Además, no había una población de monocitos definida para bloquear en las muestras no protegidas en el día 6, mientras que estas poblaciones eran distintas en el día 0 y en las formulaciones 74 y 76 en el
35 día 6.

[0061] La figura 1B muestra los datos de citometría de flujo de las muestras de control a los 0 y 6 días después del almacenamiento a 4°C. Similar a los estudios de temperatura ambiente, para el día 6 la población de monocitos en las muestras no protegidas cambió, lo que hizo que la compuerta no fuera confiable. Las formulaciones 74 y 75
40 mantuvieron una población de monocitos con poco cambio en la compuerta.

[0062] Las formulaciones 33, 74, 75 y 77 dieron como resultado una alta recuperación (>60 %) de granulocitos, linfocitos y monocitos a 4 °C el día 6 en comparación con los valores del día 0 (figura 2A). Muchos (30-87 %) de estos granulocitos, linfocitos y monocitos estaban vivos en el día 6 (figura 2B).

45 [0063] Las formulaciones 33, 74, 75 y 77 dieron como resultado una buena recuperación (45->100 %) de granulocitos, linfocitos y monocitos a temperatura ambiente el día 6 en comparación con los valores del día 0 (figura 3A). Muchos (>20 %) de estos granulocitos, linfocitos y monocitos estaban vivos el día 6 (figura 3B).

B. Monocitos CD45 positivos

[0064] Se mezcló sangre humana completa recogida en tubos K2-EDTA con un volumen igual (1 ml) de una concentración 1X de la formulación 76 de la Tabla 2. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante
50 0 o 6 días antes del análisis. Las muestras de control sin tratar se almacenaron a 4 °C y se procesaron en paralelo con las muestras de prueba. Se añadió un anticuerpo anti-CD45-FITC según las instrucciones del fabricante. Los eritrocitos se sometieron a lisis con solución de lisis BD FACS (Cat# 216667-08-2), se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 200 µL de 1X PBS. Las células restantes, predominantemente leucocitos, se suspendieron en PBS y se analizaron en el citómetro de flujo BD ACCURI a 100.000 eventos/muestra, todos los datos se adquirieron y
55 el análisis se limitó a dispersión lateral frente a fluorescencia CD45-FITC/FL-1.

[0065] Como se muestra en la Figura 4, la formulación 76 fue capaz de estabilizar la población de monocitos a 4°C, mientras que la población de monocitos no pudo ser controlada con precisión en el control no protegido.

C. Células T/linfocitos CD4 y CD8 positivos

5 [0066] Se mezcló sangre humana completa recogida en tubos K2-EDTA a una concentración 1X de las formulaciones 33 y 77 de la Tabla 2. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante 0 o 5 días antes del análisis. Las muestras de control sin tratar se almacenaron a 4 °C y se procesaron en paralelo con las muestras de prueba. Se añadió un anticuerpo anti-CD4-FITC y CD8-APC según las recomendaciones del fabricante. Los eritrocitos se sometieron a lisis con solución de lisis BD FACS (Cat# 216667-08-2), se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 200 µL de 1X PBS. Las células restantes se suspendieron en 1X PBS y se analizaron en el
10 citómetro de flujo BD ACCURI a 100.000 eventos/muestra. El análisis se limitó a la dispersión lateral versus fluorescencia CD45-FITC/FL-1.

[0067] Como se muestra en la figura 5, el número de linfocitos positivos para CD4 y CD8 disminuyó a aproximadamente el 20 % de los valores del día 0 para el día 5 a 4°C (muestra sin protección). Más del doble de linfocitos positivos para CD4 y CD8 estaban presentes en el día 5 en las formulaciones 33 y 77.

D. Granulocitos CD66b positivos

15 [0068] Se mezcló sangre humana completa recogida en tubos K2-EDTA con una concentración 1X de las formulaciones 33 o 77 de la Tabla 2. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante 6 horas antes del análisis. Las muestras de control sin tratar se almacenaron a 4 °C y se procesaron en paralelo con las muestras de prueba. Se añadió un anticuerpo anti-CD66b-FITC y BD VIAPROBE según las recomendaciones del fabricante para
20 etiquetar los granulocitos y evaluar la viabilidad celular respectivamente. Los eritrocitos se sometieron a lisis con solución de lisis BD FACS (Cat# 216667-08-2), se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 200 µL de 1X PBS. Las células restantes se suspendieron en 1X PBS y se analizaron en el citómetro de flujo BD ACCURI a 100.000 eventos/muestra. El análisis se limitó a la compuerta en la fluorescencia CD66b-FITC/FL-1 y luego a evaluar la viabilidad FSC vs (fluorescencia FL3).

25 [0069] Como se muestra en la figura 6, la formulación 33 fue capaz de estabilizar granulocitos intactos en una muestra de sangre durante un período de 8 horas a temperatura ambiente en comparación con un control sin protección. En este experimento, el 70 % de los granulocitos fueron viables después de 8 horas en una muestra desprotegida, mientras que el 98,8 % de los granulocitos estabilizados por la formulación 33 fueron viables después de 8 horas. Estos resultados demostraron la capacidad de las formulaciones y composiciones de la presente invención para
30 estabilizar granulocitos CD66b positivos intactos viables.

[0070] A menos que el contexto requiera lo contrario, a lo largo de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, la palabra "comprenden" y variaciones de la misma, tales como "comprende" y "que comprende", que se usa indistintamente con "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por" es un lenguaje inclusivo o abierto y no excluye
35 elementos o pasos del procedimiento adicionales no citados. La expresión "que consiste en" excluye cualquier elemento, paso o ingrediente no especificado en la reivindicación. La expresión "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente, comprendiendo dicha formulación:

(i) un tampón de pH;

5 (ii) un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en EDTA y gluconato de sodio;

(iii) al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

a) Ala-Gln, Gly-Gly o Gly-Gly-Gly,

10 b) un compuesto catiónico seleccionado de acetato de 2-(bencil(2-hidroxietyl)(metil)amonio), una sal interna cuaternaria, N,N-dimetil-N-(2-hidroxietyl)-3 propionato de amonio, N-etyl-piperidinio-4-butilsulfonato, acetato de 2-((3-hidroxietyl)dimetilamonio), acetato de 2-((2-hidroxietyl)dimetilamonio), acetato de 2-(2-(hidroximetyl)-1-metilpiperidinio-1-yl), acetato de 2-((2-hidroxietyl)dimetilamonio), acetato de 2-((2,3-dihidroxietyl) dimetilamonio), acetato de 2-(4-hidroxi-1-metilpiperidinio-1-yl), acetato de 2-((2-(2-hidroxietyl)etyl)dimetilamonio), acetato de 2-(bis(2-hidroxietyl)-(metil)amonio), acetato de 2-(4-(2-hidroxietyl)morfolino-4-yl), acetato de 2-(1-(2-hidroxietyl)pirrolidinio-1-yl) y propanoato de 3-((2-hidroxietyl)dimetil-amonio) y

15 c) un compuesto zwitteriónico seleccionado de bromuro de 4-(2-etoxy-2-oxoetyl)-4-ethylmorfolin-4-yl, bromuro de N-(2-etoxy-2-oxoetyl)-3-hidroxi-N,N-bis(2-hidroxietyl) propan-1-aminio, bromuro de 2-etoxy-N,N,N-trietyl-2-oxoetanaminio, bromuro de 1-(2-etoxy-2-oxoetyl)-4-hidroxi-1-metilpiperidinio, bromuro de 2-etoxy-N-(2-(2-hidroxietyl)etyl)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio, bromuro de 4-(2-hidroxietyl)-4-metyl-2-oxomorfolin-4-yl, bromuro de 4-(2-etoxy-2-oxoetyl)-4-methylmorfolin-4-yl, bromuro de 1-(2-etoxy-2-oxoetyl)-1-metilpirrolidinio, cloruro de 3-(2,3-dihidroxietyl)-1-metyl-1H-imidazol-3-yl, bromuro de 1,3-dimetil-1H-imidazol-3-yl, bromuro de 3-(2-etoxy-2-oxoetyl)-1-metyl-1H-imidazol-3-yl, bromuro de N-bencil-2-etoxy-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio, bromuro de 2-etoxy-N,N-dietyl-N-metyl-2-oxoetanaminio, bromuro de N-(2-etoxy-2-oxoetyl)-N,N-dimetilbutan-1-aminio, bromuro de 1-(2-etoxy-2-oxoetyl)-1-metilpiperidinio, bromuro de N-(2-etoxy-2-oxoetyl)-N,N-dimetilbencenamionio, bromuro de 1-(2-etoxy-2-oxoetyl)-3-hidroxi-1-metilpiperidinio, cloruro de 3-(2-(2-hidroxietyl)etyl)-1-metyl-1H-imidazol-3-yl, cloruro de 3-2-(2-(2-hidroxietyl)etoxy)etyl)-1-metyl-1H-imidazol-3-yl, bromuro de 1-metyl-3-tetradecil-1H-imidazol-3-yl y bromuro de N-(2-etoxy-2-oxoetyl)-N,N-N-dimetilciclohexanamionio; y

(iv) sucralosa; y opcionalmente fosfato de 2-glicerol, adenina, o una combinación de los mismos.

30 2. La formulación de la reivindicación 1, en la que el tampón de pH se selecciona del grupo que consiste en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 3-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico (MOPSO), ácido cítrico y una combinación de los mismos.

35 3. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la una o más células metabólicamente activas se seleccionan del grupo que consiste en un leucocito, un eritrocito, una célula tumoral circulante y una combinación de los mismos.

4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un tampón de acetato, glucosa, cloruro de potasio, mioinositol, N-metilglucamina, cloruro de magnesio o una combinación de los mismos.

5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación se selecciona de las formulaciones:

40 MES 50 mM, Ala-Gln 200 mM, sucralosa 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, pH 6,9;

MOPS 50 mM, Ala-Gln 200 mM, sucralosa 25 mM, K2-EDTA 4,4 mM, pH 7,2;

MES 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, acetato de 2-(bencil(2-hidroxietyl)(metil)amonio) 100 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 5 mM, sucralosa 25 mM, glucosa 25 mM, Ala-Gln 25 mM, pH 6,9; y

45 MES 25 mM, sal disódica de fosfato de 2-glicerol 25 mM, acetato de 2-(bencil (2-hidroxietyl)(metil)amonio) 50 mM, K2-EDTA 4,4 mM, adenina 5 mM, Sucralosa 50 mM, glucosa 25 mM, Ala-Gln 50 mM, KCl 5 mM, pH 6,9.

6. Un artículo de fabricación, que comprende la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, contenida dentro de un tubo de recolección de sangre, o un tubo de recolección de sangre evacuado.

50 7. Un procedimiento de almacenamiento sustancialmente estable de una o más células metabólicamente activas en una muestra de sangre a temperatura ambiente, que comprende: mezclar una muestra de sangre recolectada de un sujeto con las formulaciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

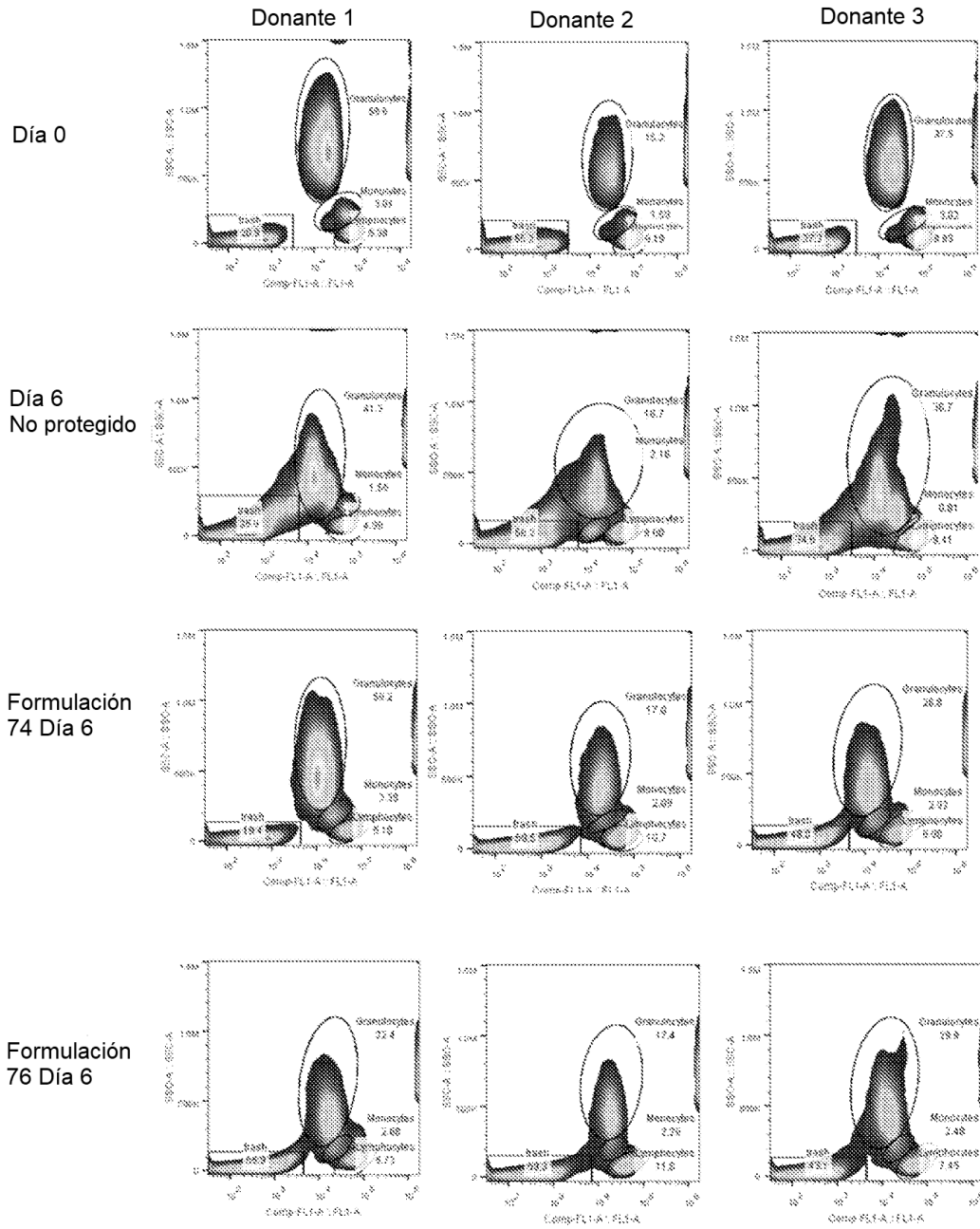


FIG. 1A

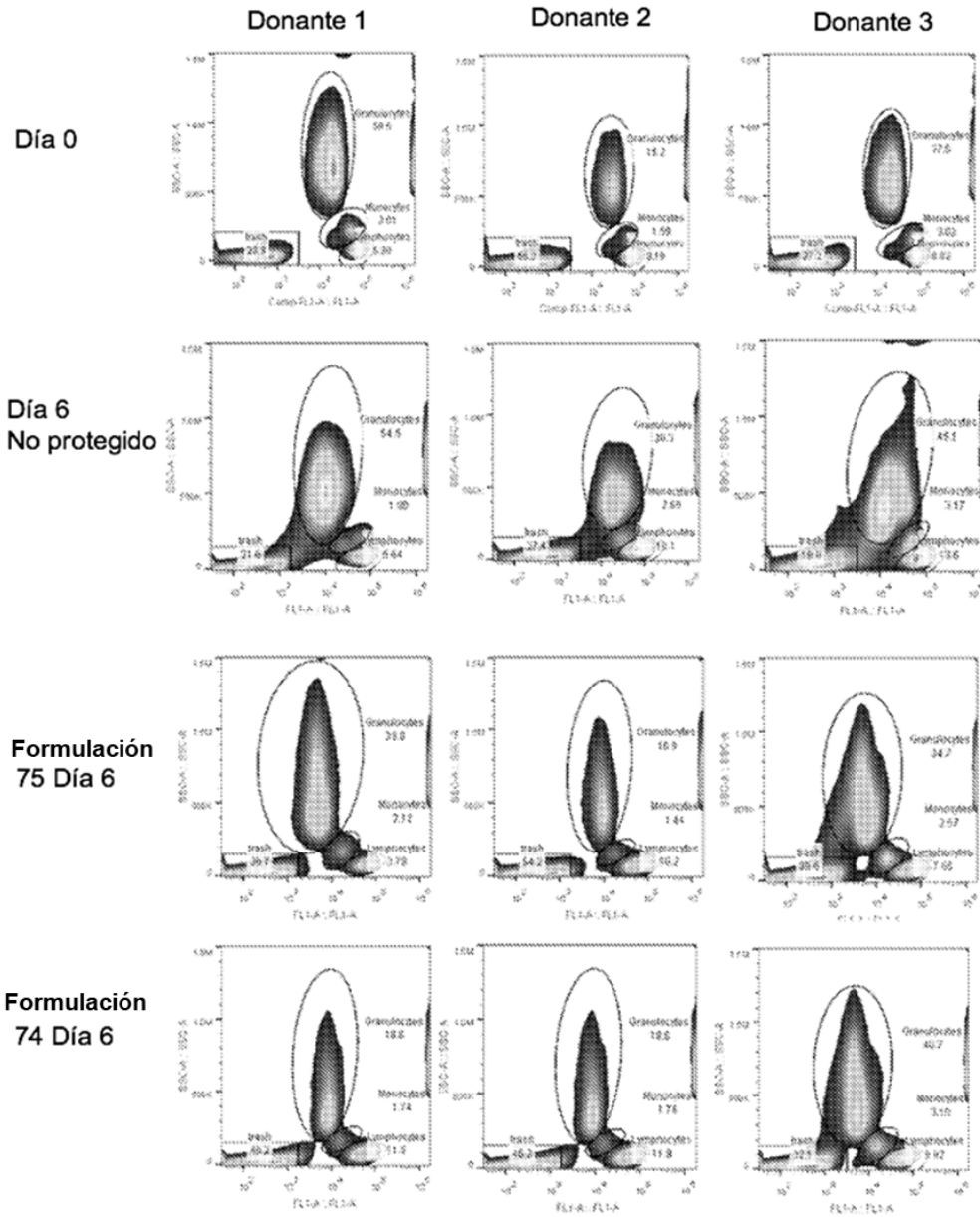


FIG. 1B

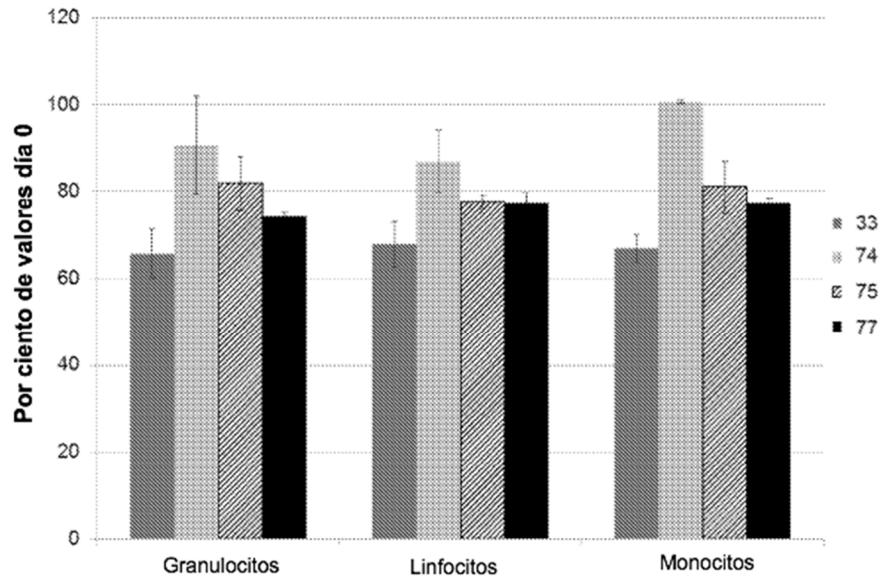


FIG. 2A

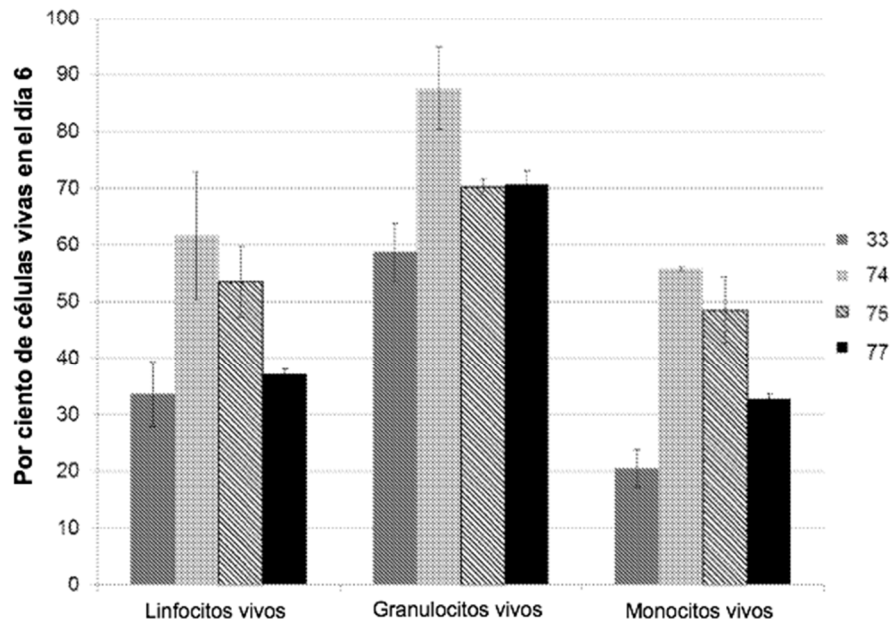


FIG. 2B

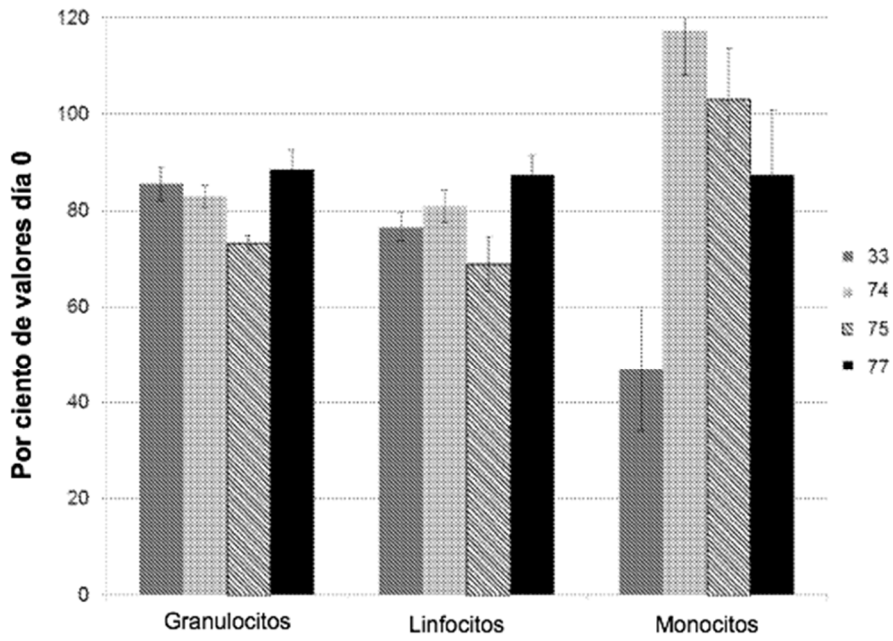


FIG. 3A

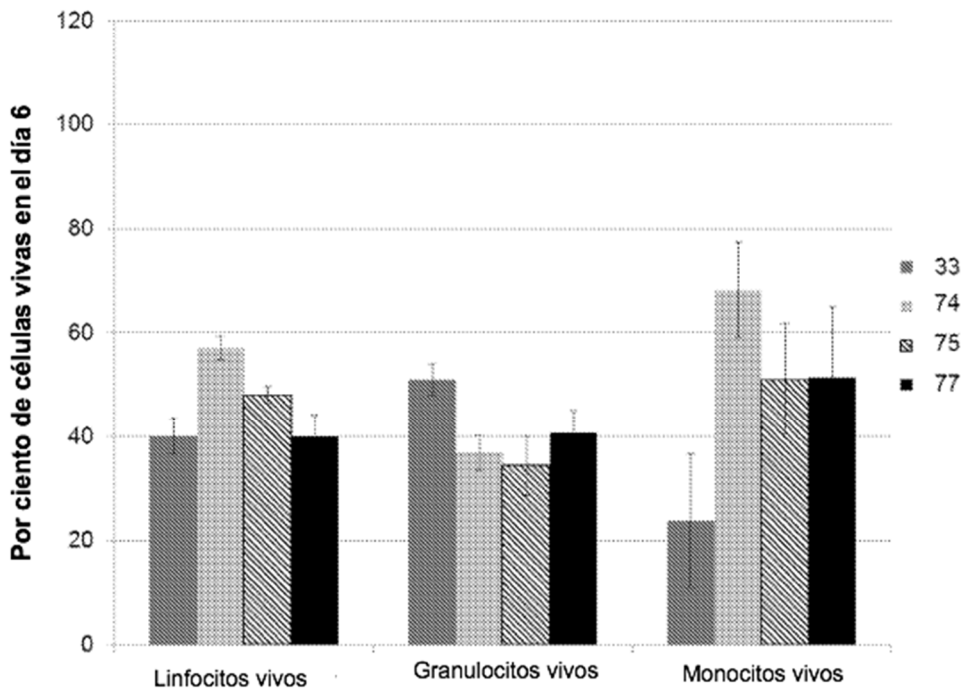


FIG. 3B

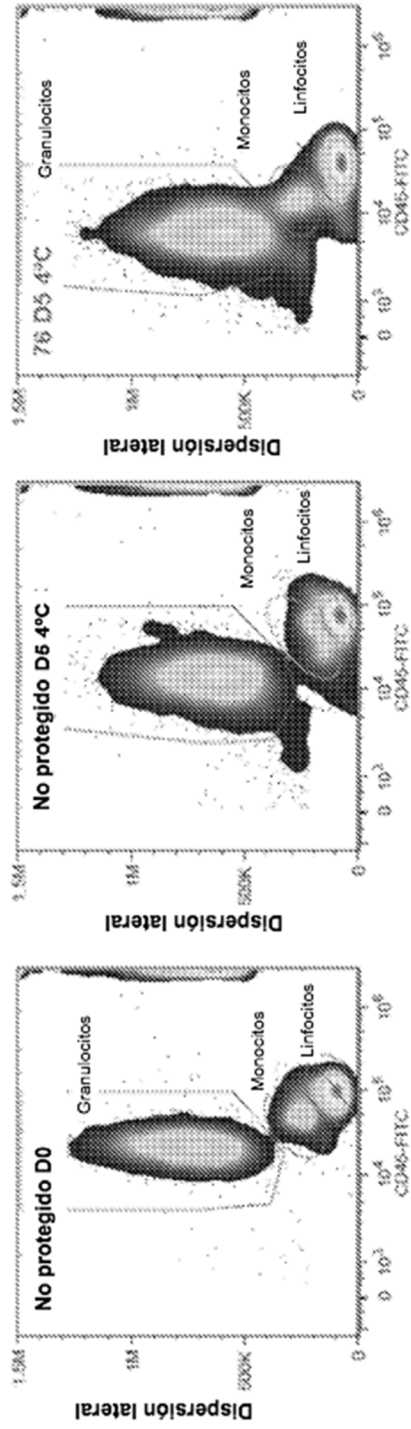


FIG. 4

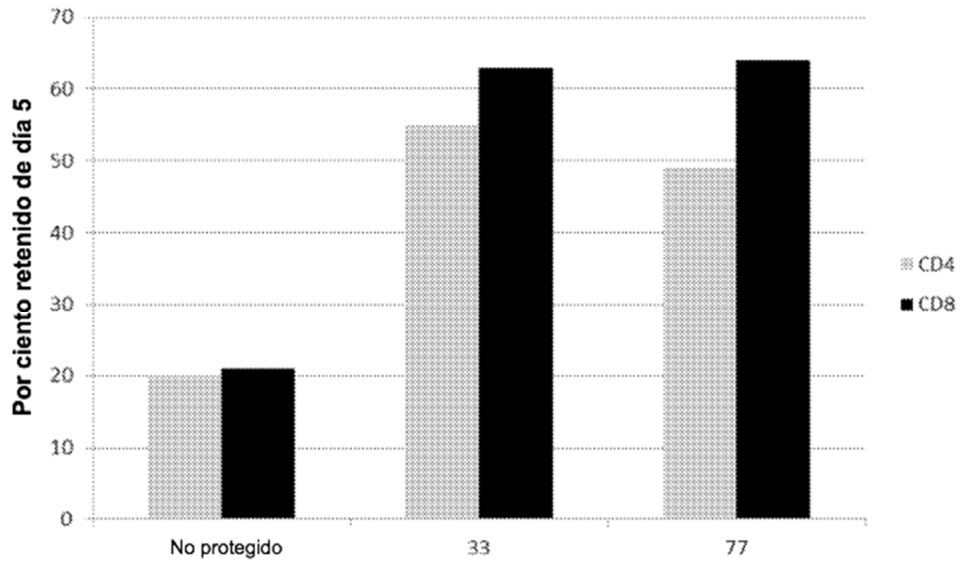


FIG. 5

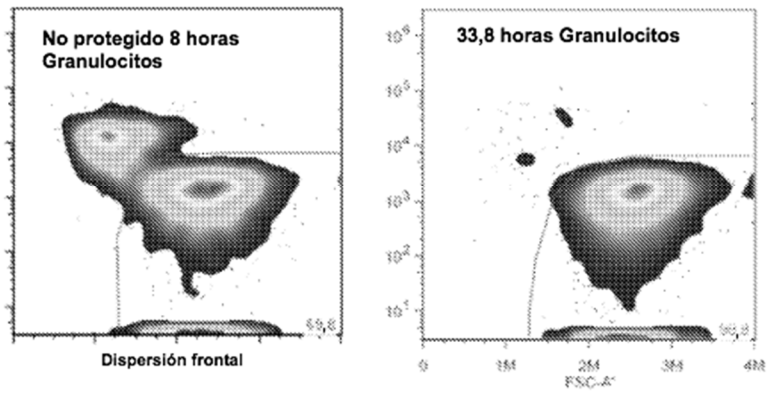


FIG. 6