



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013013414-3 B1



(22) Data do Depósito: 02/12/2011

(45) Data de Concessão: 10/01/2023

(54) Título: DISPOSITIVO PARA COLETA E ESTABILIZAÇÃO DE SANGUE OU DE UM COMPONENTE DO MESMO, USOS DO DITO DISPOSITIVO E KIT COMPREENDENDO O MESMO

(51) Int.Cl.: A61B 5/15; A61B 5/157.

(30) Prioridade Unionista: 02/12/2010 US 61/419.063.

(73) Titular(es): BECTON, DICKINSON AND COMPANY.

(72) Inventor(es): CRAIG A. GELFAND; DANIEL MARCHIARULLO; KEITH MOSKOWITZ.

(86) Pedido PCT: PCT US2011063086 de 02/12/2011

(87) Publicação PCT: WO 2012/075407 de 07/06/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/05/2013

(57) Resumo: DISPOSITIVOS DE COLETA DE SANGUE CONTENDO AGENTE DE ESTABILIZAÇÃO DE SANGUE. São revelados dispositivos (10) para a coleta e estabilização de sangue que contém um agente de estabilização de sangue que inclui variegin ou um análogo do mesmo, um dissacarídeo polissulfatado, ou uma combinação dos mesmos, cada um em uma quantidade eficaz para estabilizar o sangue. Métodos de fabricação e uso dos dispositivos, e kits contendo os dispositivos, também são fornecidos.

“DISPOSITIVO PARA COLETA E ESTABILIZAÇÃO DE SANGUE OU DE UM COMPONENTE DO MESMO, USOS DO DITO DISPOSITIVO E KIT COMPREENDENDO O MESMO”

REFERÊNCIA CRUZADA PARA PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica o benefício da data de depósito do Pedido de Patente Provisório norte americano n ° 61/419.063 depositado em 2 de dezembro de 2010, cuja divulgação é aqui incorporada por referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido contém uma listagem de sequências que foi submetida no formato ASCII via EFS-Web e é aqui incorporada por referência, na sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada em 30 de novembro de 2011, é nomeada Listagem de Sequências para Dispositivos de Coleta de Sangue_ST25.txt e tem 6,18 kilobytes de tamanho.

ESTADO DA TÉCNICA RELACIONADO À INVENÇÃO

[003] Sangue humano é avaliado in vitro para uma ampla gama de fins diagnósticos. O sangue é composto de células sanguíneas e plasma. Plaquetas, que são as menores dos três tipos principais de células sanguíneas, são cerca de apenas 20% do diâmetro das células vermelhas do sangue, a célula mais numerosa do sangue. A contagem de plaquetas normal é de 150.000 a 350.000 por microlitro de sangue, mas como as plaquetas são pequenas, elas compõem apenas uma pequena fração do volume de sangue. A principal função das plaquetas é manter a homeostase do sangue e prevenir o sangramento. A função plaquetária, portanto, é um indicador da homeostase do sangue.

[004] Homeostase do sangue refere-se à preservação da corrente sanguínea de forma intacta e funcionando normalmente. Isto inclui a manutenção de propriedades químicas do sangue e a integridade do sangue e da vasculatura. Em caso de interrupção da integridade vascular, por exemplo, de um corte, trauma,

cirurgia ou outros eventos que normalmente causam "sangramento", é iniciada uma cascata dos processos celulares e bioquímicos no sangue, com o objetivo de prevenir ou minimizar a perda de sangue. Um ponto final visual desta resposta biológica é a formação de uma crosta. Em um nível molecular e celular, os processos envolvem interações entre proteínas que normalmente circulam no sangue e plaquetas. Diversas proteínas no sangue, bem como as plaquetas em si, reagem à exposição a uma proteína chamada "fator tecidual", que está presente em muitos outros tecidos por todo o corpo, mas que está notavelmente ausente no interior das veias e artérias que compreendem a vasculatura normal. Através de vias químicas diretas e indiretas, plaquetas respondem à presença do fator tecidual por agregação, um processo irreversível (ou "apenas uma vez"), pelo qual elas mudam radicalmente a forma e se ligam ativamente umas às outras. Este processo é conhecido como agregação plaquetária. Outras enzimas no sangue também reagem e começam a alterar as proteínas no sangue, que começam a formar massas fibrosas insolúveis. Análogo ao preenchimento de um buraco com massa corrida, estas misturas insolúveis de proteínas, plaquetas, e outros componentes do sangue fecham o "buraco" na parede vascular e, em termos simples, "param o sangramento".

[005] Mais cientificamente, quando expostos a um vaso sanguíneo danificado, plaquetas aderirão à matriz subendotelial exposta. Após a adesão inicial, vários fatores são liberados ou produzidos no local da lesão (incluindo a trombina, ADP, fatores de crescimento e colágeno) que ativam as plaquetas. Uma vez que as plaquetas são ativadas, ocorre uma alteração conformacional no receptor plaquetário glicoproteína GPIIb/IIIa, permitindo sua ligação a fibrinogênio e/ou fator de von Willebrand. Acredita-se que esta ligação de moléculas multivalentes de fibrinogênio e/ou fatores de von Willebrand por receptores GPIIb/IIIa em plaquetas adjacentes resulta no recrutamento de plaquetas adicionais para o local da lesão e

sua agregação para formar um tampão hemostático ou trombo. Agregação plaquetária é um termo usado para descrever a ligação de uma plaqueta à outra. Agregação de plaquetas também está associada com degranulação, um processo através do qual grânulos ("envelopes" que contêm proteínas e pequenas moléculas) são liberados no plasma circundante. Este processo é conhecido como degranulação. Estes teores de grânulo servem para acelerar mais a restauração da homeostase e estimular processos de reparação celular (cicatrização) na parede vascular e qualquer tecido não vascular.

[006] Sem um número suficiente de plaquetas, ou em casos onde a função plaquetária normal é prejudicada ou mesmo ausente, existe um risco significativo de sangramento extenso. Transfusões de plaquetas são administradas aos pacientes que sofreram trauma grave, ou em casos de cirurgias de emergência onde houve grande perda de sangue.

[007] Compreensivelmente, as medições da capacidade de plaquetas para agregar e, assim, facilitar ou acelerar a coagulação do sangue podem ser importantes em vários ambientes clínicos. Sabe-se que a agregação de plaquetas desempenha um papel fundamental na patogênese da trombose e doença arterial coronariana aguda. Evidências sugerem que existem variações significativas na inibição da função plaquetária em resposta a vários agentes antiplaquetários. Também foi demonstrado que existe uma variabilidade inter-individual na agregação plaquetária quando antagonistas P2Y₁₂, como o clopidogrel (Plavix), são usados para o tratamento de pacientes para obter um efeito anti-agregação. Por exemplo, os resultados de um estudo demonstraram que pelo menos 10% dos pacientes que receberam a droga não alcançaram a inibição de agregação plaquetária esperada (Muller et al., *Thromb Haemost.* 89(5):783 - 7 (2003)). Assim, dada a natureza aguda de eventos cardiovasculares adversos, é essencial saber que a primeira abordagem terapêutica selecionada para um paciente terá benefícios imediatos, idealmente sem

ter que acompanhar os pacientes e ser forçado a selecionar terapias alternativas. Assim, antes de pacientes submeterem-se a essa terapia, eles muitas vezes têm amostras de sangue coletadas e testadas para a função plaquetária. Testes semelhantes são frequentemente empregados para triagem pré-cirúrgica para excluir potenciais efeitos adversos de sangramento durante a cirurgia / recuperação.

[008] Também é desejável a estabilização de plaquetas em amostras de sangue extraídas para fins de teste para testar biomarcadores de doenças. As plaquetas contêm proteínas e metabólitos de interesse diagnóstico. No entanto, a concentração das formas livremente circulantes destes biomarcadores no plasma é muito mais relevante para fins de diagnosticar condições de doença. Acredita-se que a degranulação de plaquetas, especialmente após a ativação ou agregação plaquetária, pode levar a níveis artificialmente elevados destes marcadores e representa um erro pré-analítico se não controlada. Os grânulos de plaquetas também contêm enzimas que podem catalisar a degradação destes biomarcadores circulantes e, assim, resultar em níveis artificialmente baixos de biomarcadores de interesse.

[009] Além disso, é desejável o fornecimento de plaquetas estáveis para uso em aplicações terapêuticas. A terapia gel de plaquetas autólogas (que envolve isolamento do então chamado "plasma enriquecido com plaquetas") é utilizada para tratar certas feridas e uma grande variedade de outras condições que variam de implante dentário, cura para injeções destinadas a reparar danos de ligamento. Se as plaquetas se agregam ou se tornam prematuramente ativadas, eles podem perder este efeito terapêutico. Como tal, há uma necessidade de fornecer plaquetas estabilizadas, que poderiam aumentar ainda mais estes processos.

[0010] Resultados da função plaquetária *in vitro* podem ser imprecisos se as plaquetas não são estabilizadas na extração da amostra de sangue, permitindo suas agregações antes do teste (por exemplo, nenhuma função "esquerda" para

testar), ou talvez a "morte" ou, de outra maneira, a perda de função natural antes do teste. As plaquetas são inerentemente instáveis no sangue extraído, principalmente porque seu papel natural é se agregar em resposta à ruptura da vasculatura. Estimulação química de agregação plaquetária ocorrerá espontaneamente em um nível baixo em uma amostra de sangue extraída. Ao longo do tempo depois que o sangue é extraído, as plaquetas se agregam devido a esta estimulação espontânea, e assim há cada vez menos plaquetas em seu estado original que ainda são capazes de serem estimuladas, quando a amostra de sangue for finalmente testada. A prática clínica padrão ouro atual considera que testes de função plaquetária devam ser feitos em amostras de sangue para serem realizados em uma amostra de sangue não coaguladas por citrato no prazo máximo de 2 a 4 horas após a extração do sangue (Clinical Laboratory Standards Institute Guideline, "Testes de função plaquetária por agregometria, H58-A (Vol. 28, N. ° 31 (2008)). Após este tempo, a amostra terá perdido grande parte de sua função plaquetária original que poderia não ser utilizável para medições clínicas. Isto aplicou extensos limites operacionais padrões ao amplo mercado da utilidade de testes de função plaquetária. Na prática atual, por exemplo, muitas amostras de sangue são enviadas de consultórios médicos para instalações de testes regionais e não podem ser testadas por muitas horas ou possivelmente até mesmo dias após terem sido extraídas.

[0011] Assim, permanece a necessidade de estabilização de sangue e componentes sanguíneos como plaquetas em composições como amostras de sangue coletadas que preservem melhor as funções após a coleta e durante a armazenagem ou o transporte, antes da análise.

BREVE RESUMO DA INVENÇÃO

[0012] Um aspecto da presente invenção é direcionado para um dispositivo para coleta e estabilização de sangue (por exemplo, uma amostra de sangue total) ou uma composição que contém um componente do sangue (por exemplo, um

componente celular como células brancas do sangue ou plaquetas) que tem uma primeira extremidade e uma segunda extremidade e pelo menos uma parede interior, definindo uma porção de reservatório para receber o sangue ou seus componentes. O reservatório contém um agente de estabilização de sangue que inclui variegina ou um análogo do mesmo, um dissacarídeo polissulfatado (como octasulfato de sacarose) ou uma combinação dos mesmos, cada um em uma quantidade eficaz para estabilizar o sangue, por exemplo, preservando a função plaquetária, como a sua capacidade para agregar. Embora realizações da presente invenção descrevam a função plaquetária como uma medida de estabilidade de sangue, uma pessoa versada na técnica irá apreciar que existam outras manifestações da estabilidade relativa ou instabilidade de uma amostra de sangue, medidas por outros parâmetros de sangue (por exemplo, níveis de analitos no plasma ou soro, contagem de células, estabilidade celular, integridade celular, hemólise, etc). Em algumas realizações da invenção, o dispositivo é equipado com uma tampa perfurável por uma agulha (por exemplo, para o fornecimento de sangue ao reservatório) e é estéril e evacuado.

[0013] Outro aspecto da presente invenção destina-se a um método para coleta e estabilização de sangue ou uma composição que contém um componente do mesmo (por exemplo, um componente celular como células brancas do sangue ou plaquetas), compreendendo a introdução de sangue ou da composição em um dispositivo que tem uma primeira extremidade e uma segunda extremidade e pelo menos uma parede interior, definindo uma porção de reservatório para receber o sangue ou composição, e um estabilizador de sangue disposto no reservatório, em que o agente de estabilização de sangue inclui variegina ou um análogo deste, um dissacarídeo polissulfatado (por exemplo, octasulfato de sacarose) ou uma combinação dos mesmos, cada um em uma quantidade eficaz para estabilizar o sangue, por exemplo, preservando a função plaquetária, como a sua capacidade

para agregar. Após a coleta e o armazenamento, o sangue ou a composição podem ser utilizados, por exemplo, para análise de diagnóstico ou para fins terapêuticos.

[0014] Um aspecto adicional da presente invenção destina-se a um método para a medição de um parâmetro de função de sangue (por exemplo, a função plaquetária), *in vitro*, que compreende: a) introduzir um sangue ou uma composição compreendendo um componente de sangue (por exemplo, plaquetas) em um dispositivo para coleta e estabilização de plaquetas, em que o dispositivo tem uma primeira extremidade e uma segunda extremidade e pelo menos uma parede interior, definindo uma porção de reservatório para receber o sangue ou composição, em que o reservatório contém um agente de estabilização de sangue compreendendo variegin tendo a sequência de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 1, ou um análogo da mesma, um dissacarídeo polissulfatado ou uma combinação dos mesmos, cada um em uma quantidade eficaz para estabilizar o sangue, por exemplo, preservando a função plaquetária como sua capacidade de agregação e b) medir o parâmetro do sangue. Em algumas modalidades da invenção em que o parâmetro de sangue pertence a função plaquetária, o método pode ainda implicar c) adicionar à composição um agonista de plaquetas que estimula a agregação de plaquetas e c) medir o grau de agregação de plaquetas, em que o grau de agregação plaquetária induzida pelo agonista é determinante da função plaquetária.

[0015] Um aspecto adicional da presente invenção é direcionado a um pacote ou kit que inclui pelo menos um destes dispositivos (e de preferência uma pluralidade de tais dispositivos).

[0016] Enquanto variegin e dissacarídeos polissulfatados como a octasulfato de sacarose foram relatados para uso terapêutico, com base em sua capacidade de inativar a trombina *in vivo* (e *in vitro*), os presentes requerentes descobriram (como mostrado nos exemplos do trabalho) que a atividade inibitória de

trombina não é em si só previsão da capacidade de um determinado agente para estabilizar o sangue ou seus componentes, e especialmente de plaquetas, contidas em uma amostra de sangue coletada, para qualquer tempo estendido, clinicamente significativo. Sem a intenção de se vincular a qualquer teoria particular de operação, os Requerentes teorizaram que a atividade de um dado inibidor de trombina *in vivo* não é preditiva de como ele irá funcionar em um ambiente não fisiológico como uma amostra de sangue coletada ou uma composição que contém um componente de sangue, como plaquetas (p. ex., plasma enriquecido em plaquetas (PRP)) e particularmente do ponto de vista de sua capacidade de preservar a função plaquetária, e assim, preservar a integridade da amostra para fins de armazenamento e posterior análise.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0017] Fig. 1 é uma vista em perspectiva de um dispositivo apropriado para uso na presente invenção.

[0018] Fig. 2 mostra uma série de gráficos de plotagem de agregação plaquetária em uma modalidade da invenção inventiva em comparação a uma modalidade da invenção não inventiva, como medido por impedância, como uma medida sem unidade arbitrária no eixo x, como uma função de 6 minutos de tempo de corrida (após a introdução de um estimulante de plaquetas) no eixo x.

[0019] Fig. 3 é um gráfico mostrando a agregação de plaquetas (medida como a área sob a curva (AUC)) em função do tempo em amostras de sangue coletadas em uma modalidade da invenção inventiva contendo variegina (SEQ ID NO: 1), em combinação com os ensaios utilizando o agonista de plaquetas colágeno com ou sem o antagonista de plaquetas ácido acetilsalicílico (ASA, ou aspirina), em comparação a dispositivos não inventivos contendo citrato, e colágeno com e sem ASA.

[0020] Fig. 4 é um gráfico de barras que mostra a agregação de plaquetas

(medida em termos de percentagem do valor inicial) em função do tempo, em amostras de sangue coletadas em uma modalidade da invenção inventiva contendo variegina (SEQ ID NO: 1), em combinação com colágeno utilizado como agonista de plaquetas, em comparação a um dispositivo não inventivo contendo citrato e colágeno.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0021] Em geral, os dispositivos de coleta da presente invenção podem compreender qualquer dispositivo de coleta, incluindo tubos como tubos de ensaio e tubos de centrífuga; dispositivos de coleta de sangue do sistema fechado, tais como sacos de coleta; seringas, especialmente seringas preenchidas; cateteres; microplacas e outras placas com múltiplos poços; matrizes; tubulação; recipientes de laboratório tais como frascos, frascos de centrífuga, garrafas cilíndricas, frascos, lâminas de microscópio, montagem de lâminas de microscópio, lamelas, filmes e substratos porosos e montagens; pipetas e pontas de pipetas; tecido e outros recipientes de coleta de amostras biológicas; e qualquer outro recipiente adequado para a manutenção de uma amostra biológica, bem como recipientes e elementos envolvidos na transferência de amostras. Exemplos e ilustrações de vários destes dispositivos são divulgados da patente norte americana US 7.309.468 de propriedade comum a *Stevens et al.*. O dispositivo pode ser evacuado e estéril e inclui uma tampa perfurável por uma agulha. Como alternativa, o dispositivo pode ser um sistema parcialmente evacuado ou um sistema não evacuado para coleta de sangue. Um exemplo adequado de um sistema evacuado é um tubo fechado. Uma extração manual de uma seringa é um exemplo adequado tanto de um sistema parcialmente evacuado quanto de um sistema não evacuado. Sistemas não evacuados também podem incluir sistemas de extração automáticos.

[0022] Fig. 1, que também está ilustrada na patente norte americana US 7.309.468, mostra um dispositivo de coleta de sangue típico 10, útil para a presente

invenção, que inclui um recipiente 12 definindo uma câmara interna ou reservatório 14. Na modalidade ilustrada, o recipiente 12 é um tubo oco, tendo uma parede lateral 16, uma extremidade inferior fechada 18 e uma extremidade superior aberta 20. Opcionalmente, um membro separador 13 é fornecido dentro da câmara de recipiente 14. O membro separador 13 serve para auxiliar na separação de componentes da amostra de sangue, por exemplo, por meio de centrifugação. O recipiente 12 está dimensionado para coletar um volume adequado de sangue. Meios de fechamento 22 para cobrir a extremidade aberta 20 para fechar o recipiente 12 são necessários onde é exigido um produto estéril. Em algumas realizações da invenção, o tubo é configurado para uma tampa de rosca. De preferência, o fechamento 22 forma uma vedação capaz de fechar efetivamente o recipiente 12 e mantendo uma amostra biológica na câmara 14. O fechamento 22 pode ser um de uma variedade de formas incluindo, mas não se limitando a, tampas de borracha, fechamentos HEMOGUARD™, vedações metálicas, vedações de borracha com bandas metálicas e vedações de diferentes polímeros e desenhos. Um escudo protetor 24 pode recobrir o fechamento 22.

[0023] Recipiente 12 pode ser feito de qualquer material apropriado para recipientes de laboratório, incluindo, por exemplo, plásticos (por exemplo, poliolefinas, poliamidas, poliésteres, silicones, poliuretanos, epóxis, acrílicos, poliacrilatos, poliésteres, polissulfonas, polimetacrilatos, PEEK, poliamida e fluoropolímeros) e produtos de vidro, incluindo vidro de sílica. De preferência, o recipiente 12 é transparente. Exemplos de materiais termoplásticos transparentes para o recipiente 12 incluem policarbonatos, polietileno, polipropileno e polietilenotereftalato. Materiais plásticos podem ser materiais impermeáveis à oxigênio ou podem conter uma camada impermeável a oxigênio ou semipermeável. Alternativamente, o recipiente 12 pode ser feito de um material plástico permeável à água e ar.

[0024] A pressão na câmara 14 é selecionada para extrair um volume pré-determinado de amostra biológica na câmara 14. De preferência, o fechamento 22 é feito de um material resiliente que é capaz de manter a pressão interna diferencial entre a pressão atmosférica e uma pressão inferior à atmosférica. O fechamento 22 é tal que pode ser perfurado por uma agulha 26 ou outra cânula para introduzir uma amostra biológica no recipiente 12, como conhecido no estado da técnica. De preferência, o fechamento 22 é resselável. Materiais apropriados para o fechamento 22 incluem, por exemplo, borracha de silicone, borracha natural, borracha de butadieno estireno, copolímeros etileno-propileno e policloropreno.

[0025] Exemplos adequados de recipiente 12 incluem tubos de camadas simples e tubos multicamadas. Um exemplo mais específico de um recipiente adequado 12 é divulgado na patente norte americana US 5.860.937.

[0026] Recipiente 12 também pode conter um separador 13 como um gel, um separador mecânico ou outro tipo de membro separador (por exemplo, papel de filtro ou similares). Separadores são geralmente úteis para preparação do plasma sanguíneo, especificamente para separar o plasma humano ou animal do sangue total. Em algumas modalidades da invenção, o separador tem uma densidade que é intermediária entre células brancas e plaquetas, e que pode ser útil no isolamento do PRP de outros elementos celulares de uma amostra de sangue total. O gel é desejavelmente uma formulação de gel polimérica tixotrópica. O gel pode ser um homopolímero ou copolímero e pode incluir géis com base de silicone tais como, por exemplo, polissiloxanos ou géis com base de hidrocarbonetos orgânicos tais como, por exemplo, poliacrílicos, poliésteres, poliolefinas, polibutadienos cis oxidados, polibutenos, misturas de óleo de soja epoxidado e hidrocarbonetos clorados, copolímeros de diácidos e propanodióis, ciclopentadienos hidrogenados e copolímeros de alfa olefinas dialquilmaleatos. Exemplos de separadores mecânicos que podem ser úteis na presente invenção são descritos nas patentes norte

americanas US 6.516.953; US 6.406.671; US 6.409.528; e US 6.497.325.

[0027] O recipiente 12 também pode ser adaptado para a separação de linfócitos e monócitos por centrifugação de fases mais pesadas de uma amostra de sangue total. Em tais realizações, os dispositivos podem também conter um meio líquido de gradiente de densidade e um meio para evitar a mistura do meio líquido de gradiente de densidade com uma amostra de sangue antes da centrifugação. Um exemplo de um tubo de coleta apropriado para linfócitos/monócitos é divulgado na patente norte americana US 5.053.134.

[0028] Além da realização da invenção ilustrada na Fig. 1, outros tubos de coleta de sangue disponíveis comercialmente adequados para uso na presente invenção incluem os seguintes, todos os quais são vendidos pela Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ), com todos os registros e marcas registradas pertencentes a, Becton, Dickinson and Company: tubos de hematologia VACUTAINER® (por exemplo, n°s de catálogo 367650 - 1, 367661, 6405, 6385, 6564, 367653, 367665, 367658, 367669, 6450 - 8, 6535 - 37 and 367662); tubos K₂EDTA VACUTAINER® (por exemplo, n°s de catálogo 367841 - 2, 367856 e 367861); e tubos Microtainer® BD não evacuados com fechamento Microgard™ BD (por exemplo, 365987, 365965, e 365974) ou tubos Microtainer® BD convencionais (por exemplo, 365956, 365957, 365958, 365959, 365971, e 365973). Muitos tubos de coleta de sangue comerciais têm volumes padrão normalmente variando de 250 microlitros até e incluindo cerca de 10,0 ml e em alguns casos até 16 ml. Volumes típicos incluem 250, 400 e 500 microlitros, tanto quanto 2,0 ml, 3,5 ml, 4,0 ml, 5,0 ml, 8,0 ml, 8,5 ml e 10,0 ml.

[0029] Em outras formas de realização, o dispositivo pode incluir um reservatório integrado dentro de um cartucho de teste, o reservatório capaz de manter um volume de sangue total variando de 2 a 200 microlitros, mais preferencialmente de 50 a 150 microlitros. Esses cartuchos são vendidos, por

exemplo, sob o nome comercial i-STAT Point of Care System pelos laboratórios Abbott (Abbott Park, Illinois) e são utilizáveis com um analisador portátil capaz de realizar a interface com o cartucho. Exemplos de tais cartuchos e analisadores portáteis úteis para a presente invenção incluem o cartucho i-STAT CHEM8+ e o analisador portátil i-STAT® 1, respectivamente. Tais dispositivos são ensinados, por exemplo, nas patentes norte-americanas US 5.096.669, 5.112.455, 5.821.399, 5.628.961, 7.419.821, 6.750.053 e US D337.164.

[0030] Em algumas formas de realização, o dispositivo é uma seringa. Um conjunto de seringa pode incluir um barril, tendo uma extremidade proximal aberta, uma extremidade distal e uma câmara oca estéril entre as extremidades proximais e distais para receber o sangue; um êmbolo localizado na extremidade proximal aberta; uma agulha presa ao barril; e um agente de estabilização de plaquetas dentro da câmara.

[0031] Os dispositivos da presente invenção podem ser feitos ou montados em conformidade com os materiais, reagentes e processos conhecidos no estado da técnica. A título de exemplo, um método envolve a adição de um estabilizador de plaquetas pelo menos um agente de estabilização de plaquetas (que como aqui descritos pode ser na forma seca ou liofilizada) em uma quantidade efetiva para estabilizar plaquetas no dispositivo; e, em seguida, opcionalmente, adicionar um membro separador para o dispositivo e evacuar e/ou esterilizar o dispositivo.

[0032] Um processo de liofilização/evacuação pode implicar as etapas de congelamento do dispositivo a uma temperatura de cerca de -40 °C a uma pressão de cerca de 760 mm por cerca de 6 a 8 horas; secagem do dispositivo conforme a temperatura aumenta de -40 °C a cerca de 25°C, a uma pressão de cerca de 0,05 milímetros, por cerca de 8 a 10 horas; e então evacuar o dispositivo à uma temperatura de cerca de 25°C e uma pressão de cerca de 120mm para cerca de 0,1 horas e, em seguida, esterilizar o dispositivo, por exemplo, com radiação de cobalto

60. Aditivos e anticoagulantes podem ser adicionados ao tubo em uma forma líquida e posteriormente secos desta maneira.

[0033] Como aqui usado, os termos "sangue" e "amostra de sangue" referem-se a sangue total ou um componente do mesmo (por exemplo, uma composição como outro tecido do corpo ou fluido que contenha um componente do sangue), especialmente um componente celular do mesmo, incluindo, por exemplo, os concentrados de células vermelhas do sangue, concentrados de plaquetas (p. ex., plasma enriquecido em plaquetas (PRP)), concentrados de leucócitos; ou plasma e soro. Assim, em outras formas de realização, a amostra pode ser um corpo fluido ou tecido contendo células do sangue ou de células imaturas do sangue, tais como medula óssea.

[0034] Em algumas formas de realização, o agente de estabilização do sangue é um peptídeo de ocorrência natural ou sintético extraído ou derivado de glândulas salivares de artrópodes hematófagos, preferencialmente de glândulas salivares de um carrapato e, mais preferencialmente, de glândulas salivares de *Amblyomma variegatum*. Tais peptídeos são divulgados no WO29017699, WO03091284 e WO28155658. Tais peptídeos são também divulgados em Cho, et al., J. Biol. Chem. 282(40):29101 - 13 (2007). Variegin e seus análogos são "inibidores diretos da trombina", que, como conhecido no estado da técnica, se referem a agentes que ligam o sítio ativo da trombina e podem, portanto, inativar tanto trombinas solúveis quanto trombinas ligadas a fibrinas.

[0035] Em algumas formas de realização, o agente de estabilização de sangue tem a sequência de aminoácidos 32 NH₂-SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES-ácido, designada como SEQ. ID NO: 1 (e aqui referida como variegin). Equivalentes funcionais ou análogos de variegin, que, para efeitos da presente invenção, incluem variantes, fragmentos (e suas variantes) e derivados da SEQ ID NO: 1, podem também ser úteis na presente

invenção, desde que conservem a atividade de estabilização de plaquetas necessária. Fragmentos de variegín serão tipicamente idênticos a SEQ ID NO: 1, exceto para a perda de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos do N-terminal e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mesmo mais aminoácidos do C-terminal da sequência da proteína do variegín.

[0036] Variantes de variegín tipicamente conterão substituições de aminoácidos conservados quando comparados a SEQ ID NO: 1. Tais substituições típicas estão entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser e Thr; entre os resíduos ácidos de Asp e Glu; entre Asn e Gln; entre os resíduos básicos de Lys e Arg; ou entre os resíduos aromáticos de Phe, Trp e Tyr. Em algumas formas de realização da invenção, as substituições de aminoácidos são nas posições 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 22, 25 e 31 da SEQ ID NO: 1. Assim, em algumas formas de realização, a variante de variegín difere da SEQ ID NO: 1 em termos de uma ou mais das seguintes substituições: Gly na posição 4 é substituída por Ala ou Ser; Asp na posição 5 é substituído por Gly; Val na posição 6 é substituída por Arg; Glu na posição 8 é substituída por Gln; Lys na posição 10 é substituída por Arg; Met na posição 11 é substituída por Leu; His na posição 12 é substituída por Pro; Lys na posição 13 é substituída por Arg; Thr na posição 14 é substituída pelo Asn; Pro na posição 17 é substituída por Gln; Phe na posição 18 é substituído por Gly; Ala na posição 22 é substituída pela Glu; Glu na posição 25 é substituída por Asp; e Glu na posição 31 é substituída por His.

[0037] Exemplos representativos de fragmentos de variegín são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

Peptídeo	Sequência		
SEQ.ID. NO. 1	NH ₂ - SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDES - ácido		

SEQ.ID. NO. 2	NH ₂ - SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLD - ácido		
SEQ.ID. NO. 3	NH ₂ - SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEE - ácido		
SEQ.ID. NO. 4	NH ₂ - GDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDDES - ácido		

[0038] Um outro fragmento de varieggin que pode ser útil para a presente invenção é SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYL (SEQ ID NO: 5).

[0039] Fragmentos de varieggin podem também conter substituições de aminoácidos em uma ou mais das posições descritas acima. Exemplos representativos de tais fragmentos incluem fragmentos tendo uma sequência de aminoácidos que inclui:

SDQGDVAEPAMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDDES (K10A)(SEQ ID NO:6),
SDQADRAQP~~K~~LHRNAPQGDFEAIPEEYL (SEQ ID NO:7),
SDQSGRAQP~~K~~LPRNAPQGDFEAIPEEYL (SEQ ID NO:8),
SDQGDVAEPKMHKTAPPGDFEAIPEEYLD (SEQ ID NO:9),
SDQADVAEPKMHKTAPPGDFEAIPEEYLD (SEQ ID NO:10),
EPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDDES (EP25) (SEQ ID NO:11)
EPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDDES (EP25A22E) (SEQ ID NO:12)
EPKMHKTAPPFDFEAIPEEYL (EP21) (SEQ ID NO:13)
MHKTAPPFDFEAIPEEYL (MHI 8) (SEQ ID NO:14)
DVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYL (DV24) (SEQ ID NO:15)
e DVAEPRMHKTAPPFDFEAIPEEYL (DV24, K10R) (SEQ ID NO:16).

[0040] Assim, variantes, fragmentos e variantes de fragmentos tipicamente possuem pelo menos cerca de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou cerca de 97% de similaridade de sequências com a SEQ ID NO: 1.

[0041] Derivados de varieggin e suas variantes e fragmentos podem também ser úteis na prática da presente invenção. Exemplos representativos de tais derivados incluem formas modificadas de varieggin e suas variantes e fragmentos que

são modificados pela adição de grupos açúcar (por exemplo, grupos glicosil) ou grupos de polímero (p. ex., PEG) aos resíduos de aminoácidos na sequência de variegín. Em algumas formas de realização da invenção, os derivados são formas glicosiladas de variegín em que a Thr na posição 14 da SEQ ID NO: 1 é modificada por uma porção de hexose. Outras formas de realização podem incluir outras modificações pós-traducionais conhecidas pelos versados na técnica, incluindo fosforilação, frequentemente incluída em resíduos de serina, treonina ou resíduos de tirosina, sumoilação, adição de vários ácidos graxos ou cadeias lipídicas, e tudo isso pode ser sozinho ou em combinações. Além disso, há variações naturais ou construídas de aminoácidos que podem substituir resíduos na sequência, como a citrulina como um análogo de arginina sem carga, metil-lisina como um análogo de lisina sem carga, hidroxiprolina como um análogo estrutural da prolina, entre muitas outras alternativas conhecidas para aqueles versados na técnica.

[0042] Variegín e seus análogos podem ser sintetizados de acordo com procedimentos conhecidos, por exemplo, química de síntese de peptídeos, incluindo técnicas de química de fase líquida e sólida. Por exemplo, a síntese de peptídeos pode ser realizada através de qualquer um dos métodos de síntese de peptídeos de fase sólida (SPPS) (por exemplo, abordagens de química Fmoc ou t-Boc), os quais são bem conhecidos das pessoas hábeis na técnica. Normalmente estas sínteses são realizadas em instrumentos de síntese de peptídeos automatizados. Em outras formas de realização da invenção, os peptídeos podem ser produzidos em microorganismo ou outros organismos não-humanos geneticamente modificados (por exemplo, por transformação) com um ácido nucleico que codifique variegín ou seus análogos.

[0043] Outros agentes de estabilização de sangue úteis na presente invenção incluem dissacarídeos polissulfatados. O componente do dissacarídeo é, tipicamente, lactose, trealose, sacarose, maltose ou celobiose. Em algumas

realizações da invenção, o componente do dissacarídeo é sacarose ou trealose. O número de grupos sulfato nos componentes do dissacarídeo normalmente varia de 4 a 8. Assim, formas de realização da invenção incluem lactose tetrassulfatadas, pentassulfatadas, hexassulfatadas, heptassulfatadas e octassulfatadas, sacarose, maltose e celobiose. Ver, por exemplo, Wall, *et al.*, *Thromb. Res.* 103:325 - 35 (2001); Sarilla, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 285(11):8278 - 89 (2010). Nos exemplos das formas de realização da invenção, o dissacarídeo polissulfatado é octasulfato de sacarose (SOS) ou octasulfato de trealose. Os dissacarídeos polissulfatados são inibidores indiretos da trombina que, como conhecido no estado da técnica, são agentes que agem como parte de um complexo de antitrombina e não interagem diretamente com o sítio ativo da trombina, de modo que eles só podem inativar trombina solúvel, mas não podem reagir com trombina ligada a fibrina. SOS é conhecido por atuar através do cofator II da heparina, de modo que o complexo SOS-HCII se liga e inibe a trombina.

[0044] O agente de estabilização de sangue também pode incluir pelo menos um outro inibidor direto da trombina e/ou pelo menos um outro inibidor indireto da trombina. Exemplos representativos de inibidores diretos da trombina que podem ser úteis na presente invenção incluem argatrobana, (((2R,4R)-1-[(2S)-5-(diaminometilideneamino)-2-[(3R)-3-metil-1,2,3,4-tetraidroquinolin-8-il]-sulfonilamino]pentanoil]-4-metil-piperidine-2-ácido carboxílico), hirudina e seus análogos bivalirudina, derivados do pentapeptídeo RPPGF que contêm um D-isômero e/ou um aminoácido não usual, por exemplo, rOicPaF (p-Me)-NH₂ (conhecido no estado da técnica como "FM-19"), rOicPsF(p-Me), rOicPaF(p-Br), rOicPaF(p-I), rOicPaF(p-NO₂), F (p-Me)OicrPa, aPrOicF(p-Me), PaF (p-Me) rOic, PF (p-Me)Oicra, e PraF (p-Me) Oic (em que o D-isômero é designado pela letra minúscula pequena, e "Oic" representa o aminoácido sintético (2S, 3aS, 7aS)-octaidroindol-2-ácido carboxílico (p. ex., Nieman et al., *J. Thrombosis Haemostasis*

6:837 - 845 (2008)), aprotinin, a peptide with known thrombin inhibition potential (e.g., Pintigny *et al.*, Eur. J. Biochem. 207:89 - 95 (1992)), and D - phenylalanyl - L - prolyl - L - arginine chloromethyl ketone (PPACK), known as a heparin alternative (e.g., Lyon *et al.*, Clin. Chem. 41:1038 - 1041 (1995)).

[0045] Exemplos representativos de inibidores indiretos da trombina que podem ser úteis na presente invenção incluem heparina em suas diversas formas, definidas pela distribuição de peso molecular da preparação específica (por exemplo, peso molecular baixo, não fracionada (normalmente uma fração de 3-7 kilodaltons), peso molecular ultra baixo (normalmente 2-3 kilodaltons) e subfrações similares de tamanhos específicos). Subfrações terapêuticas de heparina, isoladas por meio de diferentes métodos de desfracionamento com base no tamanho ou em vários processos de extração química, incluem dalteparina, enoxaparina, adreparina, parnaparina, reviparina, tinzaparina, bioparina, miniparina, sandoparina, semuloparina e nadroparina e outras moléculas semelhantes.

[0046] O modo de purificação pode depender do método de síntese. Em geral, a pureza do agente de estabilização de sangue irá variar dependendo do agente utilizado e sua origem. Em geral, a pureza do agente de estabilização de plaquetas é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%, ou ainda maior.

[0047] O agente de estabilização de sangue está presente no dispositivo de coleta em uma quantidade eficaz para preservar a função do sangue testável em laboratório e seus componentes. Por exemplo, no caso das plaquetas, a quantidade é eficaz para preservar a função plaquetária, que pode incluir a sua capacidade de agregação e de evitar ou inibir a degranulação plaquetária que ocorre quando as plaquetas não são preservadas e assim perdem seu estado granulado nativo, e/ou para estabilizar uma ou mais proteínas endógenas que podem estar presentes em uma porção de plasma do sangue ou amostra de sangue ou composição que

contém um componente sanguíneo. A escolha do agente de estabilização de sangue específico e a quantidade ou concentração para incluir no dispositivo depende de vários fatores, incluindo a natureza da amostra, a potência de cada agente e sua solubilidade em água, a quantidade de tempo de estabilização de sangue desejada, o volume do dispositivo de coleta de sangue, o grau de hemólise causada pela adição do agente na amostra, e a natureza e a extensão das interações não específicas (por exemplo, devido a presença de outras proteínas no sangue, como a albumina sérica). Assim, para efeitos da presente invenção, a quantidade de agente de estabilização de sangue que pode estar presente é mais convenientemente expressa em termos de um intervalo de concentração (do qual a quantidade real do agente pode ser facilmente calculada).

[0048] Em relação às plaquetas, a preservação da função significa que as plaquetas são mantidas após a coleta e antes da análise em um estado na qual elas podem ser ativadas ou reativadas de modo que a agregação de plaquetas (como uma medida da função plaquetária) pode ser medida *in vitro*. Ativadas ou reativadas, como aqui usado no contexto das plaquetas, significa que a capacidade das plaquetas para iniciar uma cascata de ligação de plaquetas e agregação é preservada para análises *in vitro* em um laboratório, mas que a agregação plaquetária é inibida de ser induzida como um artefato de coleta, transporte e armazenamento em dispositivos de coleta de sangue típicos para procedimentos de diagnóstico *in vitro*.

[0049] Por exemplo, alguns agentes de estabilização de sangue são mais potentes do que outros e assim vão exigir uma menor concentração por ml de amostra, dependendo da utilidade. Diferentes quantidades de agentes de estabilização de sangue podem ser necessários para estabilizar componentes do sangue, como plaquetas que podem estar presentes em uma composição enriquecida (como o PRP) em comparação com o mesmo volume de uma amostra

de sangue total (por exemplo, que conteria menos componentes tais como as plaquetas por unidade de volume).

[0050] Em geral, pelo menos um agente de estabilização de sangue pode ser selecionado para atingir pelo menos cerca de 50% da atividade de inibição de agregação à temperatura ambiente, preferencialmente no intervalo de pelo menos cerca de 60% a cerca de 75% para a atividade inibitória e mais preferencialmente pelo menos cerca de 75% atividade inibitória, ao longo do curso de coleta e de armazenamento e/ou de transporte, até ao momento de teste analítico ou uso terapêutico. Dependendo da necessidade, a estabilização pode ser alcançada por pelo menos 1 hora até cerca de 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 horas ou mais.

[0051] Profissionais qualificados apreciarão as amostras hemolisadas são um óbvio indício visual que ocorreram danos às células do sangue durante a coleta, transporte ou armazenamento de amostras de sangue. Embora hemólise não seja necessariamente prejudicial para qualquer é um interferente bem conhecido para alguns testes, e, portanto, é preferível evitar hemólise. Hemólise pode ser medida por escala visual (por exemplo, suave ou ligeiramente rosa, moderada ou visivelmente vermelha, ou grave ou vermelho-escuro). Hemólise também pode ser medida por medida espectroscópica da cor vermelha da hemoglobina e pode ser relatada pela concentração de hemoglobina liberada no soro ou plasma (por exemplo, de tal forma que menos do que cerca de 20mg/dL de concentração de hemoglobina liberada, ou para um grau em que a concentração de hemoglobina não possa ser medida visualmente ou por espectroscopia representa hemólise "pequena ou insignificante", cerca de 20 a cerca de 100 mg/dL representa hemólise "leve", cerca de 100 a cerca de 300 representa hemólise "moderada", ou maior do que cerca de 300 mg/dL representa hemólise "grave").

[0052] Com o que foi dito acima em mente, a concentração do agente de estabilização de sangue geralmente varia de cerca de 100nm a cerca de 50mM e em

algumas formas de realização de cerca de 1µm a cerca de 10mM e em algumas formas de realização de cerca de 5µm a cerca de 5mM e em algumas formas de realização de cerca de 20µm a cerca de 3mM e em algumas formas de realização de cerca de 50µm a cerca de 2mM.

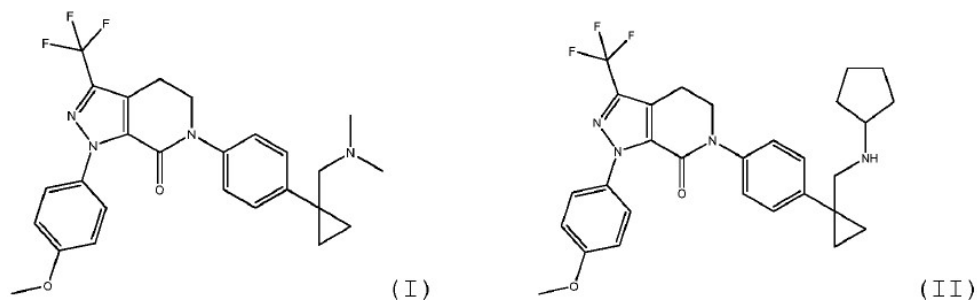
[0053] Por exemplo, a concentração de variegina ou seu análogo geralmente varia de cerca de 1 µM a cerca de 10mM. Em outras formas de realização, a concentração de agente de estabilização de sangue varia de cerca de 1 µM a cerca de 10mM. Ainda em outras formas de realização, a concentração de variegina ou seus análogos varia de cerca de 10µM, a cerca de 1mM. Ainda em formas de realizações adicionais, a concentração de variegina ou seus análogos varia de cerca de 25µM a cerca de 500µM. Em outras formas de realização, a concentração de variegina ou seus análogos varia de cerca de 50 µM a cerca de 300µM. Em ainda outras formas de realizações, a concentração de agente de estabilização de sangue é cerca de 150µM, e em outras formas de realização é cerca de 300µM.

[0054] A concentração de dissacarídeo polissulfatado geralmente varia de cerca de 50 µM a cerca de 50mM. Em outras formas de realização, a concentração de dissacarídeo polissulfatado varia de cerca de 250µM a cerca de 25mM. Ainda em outras formas de realização da invenção, a concentração de dissacarídeo polissulfatado varia de cerca de 1mM a cerca de 5mM e em ainda outras formas de realização da invenção de cerca de 2 mM a cerca de 3mM. Ainda em formas de realizações da invenção adicionais, a concentração de dissacarídeo polissulfatado é de cerca de 2mM, e em outras formas de realização é de cerca de 3mM. Todas as subvariações dentro destas variações também são contempladas. O termo "cerca de" como usado com relação a todos os valores de concentração aqui divulgado refere-se à variabilidade (valor +/-) de 50%.

[0055] O agente de estabilização de sangue pode estar em qualquer forma adequada incluindo uma solução, suspensão ou outro líquido, um precipitado, um

comprimido, uma cápsula, um material seco por pulverização, um material seco por congelamento, um pó, uma partícula, um gel, cristais ou um material liofilizado. O agente de estabilização de sangue é, de preferência, introduzido no reservatório do recipiente a fim de otimizar a vida útil do agente, ou seja, para evitar a degradação do agente de estabilização de sangue que resultaria em eficácia reduzida. O fornecimento do agente na forma seca, por exemplo, forma liofilizada, é vantajoso já que oferece boa estabilidade e também permite a esterilização subsequente, ambos os quais são a chave do ponto de vista de automação e padronização. Além de ser disposto no reservatório, o agente de estabilização de sangue pode estar localizado em qualquer superfície do dispositivo. O agente de estabilização também pode ser disposto na parede interior, tampas e lacres para fechamento de tais dispositivos ou em mecânicos, ou outras inserções colocadas dentro dos dispositivos.

[0056] Além do agente de estabilização de sangue, o dispositivo da presente invenção pode também conter um anticoagulante. Coagulação da amostra não impede necessariamente de maneira negativa a medição de agregação plaquetária, mas a formação de muito material insolúvel eventualmente impede o acesso suficiente da amostra líquida a ser testada. Amostras completamente coaguladas são inúteis para estudos de plaquetas. Assim, evitar a formação de material insolúvel é um atributo preferível de uma amostra de sangue para testes de função do sangue. Anticoagulantes podem aumentar a anticoagulação, estabilização do sangue e/ou efeitos anti-hemolíticos fornecidos por heparina e/ou os dissacarídeos polissulfatados. Exemplos representativos de anticoagulantes que podem ser úteis na presente invenção incluem inibidores do Fator Xa de coagulação, inibidores do Fator VII, inibidores de Fator IX, inibidores do Fator XII e outros inibidores da trombina (Fator II). Vários exemplos representativos de inibidores do Fator Xa são descritos em Qiao et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19:462 - 468 (2009), as estruturas de dois dos quais são como segue:



I = 6-(4-{1-[(dimetilamino)metil]ciclopropil}fenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1,4,5,6-tetraidro-7H-pirazolo[3,4-c]piridin-7-ona; II = 1-(4-metoxifenil)-6-[4-[1-(pirrolidin-1-ilmetil)ciclopropil]fenil]-3-(trifluorometil)-4,5-dihidropirazolo[3,4-c]piridin-7-ona.

[0057] Quantidades destes anticoagulantes em particular geralmente variam de 100µg/ml a 25 mg/ml e em algumas formas de realização de cerca de 1mg/ml, a cerca de 10 mg/ml.

[0058] Em algumas formas de realização, o agente anticoagulante adicional é argatrobana e seus derivados (p. ex., Tamura et al., *Circ. J.* 73(3):540-8 (2009) and Kalb *et al.*, *Platelets* 20(1):7-11 (2009)). A concentração de argatrobana geralmente varia de cerca de 1µM a cerca de 2mM e em algumas formas de realização de cerca de 10µM a cerca de 1mM e em ainda outras formas de realização de cerca de 25µM a cerca de 100µM.

[0059] Em outras formas de realização, anticoagulante adicional é antistasina ou um peptídeo relacionado à antistasina (um fragmento peptídico derivado da proteína antistasina) (ver Ohta *et al.*, *Thromb Haemost.* 72(6):825 - 30 (1994)) A concentração de antistasina geralmente varia de 100nM a cerca de 2mM e em algumas formas de realização de cerca de 1µM a cerca de 100µM.

[0060] Exemplos de outros anticoagulantes que podem ser úteis para a presente invenção incluem antitrombina III (Jorgensen et al., *Biochem. J.* 231 (1): 59-63 (1985)) e E-76, que é um peptídeo derivado de seleção de biblioteca de fago contra o complexo do Fator-VIIa de tecidos (Dennis et al., *Nature* 404 (6777): 465-70 (2000)).

[0061] Os dispositivos da presente invenção também podem incluir meios de carregar (por exemplo, água ou álcool), meios de estabilização (polivinilpirrolidona, trealose, manitol, etc.) e/ou um ou mais aditivos adicionais para tratar o sangue ou amostra de sangue. Aditivos apropriados incluem o fenol, misturas de fenol/clorofórmio, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos orgânicos, sais de ácidos orgânicos, sais de metais alcalinos de halogenetos, agentes quelantes orgânicos, corantes fluorescentes, anticorpos, agentes de ligação (não agentes quelantes), agentes tamponantes e qualquer outro reagente ou combinação de reagentes usados normalmente para tratar amostras biológicas para análise.

[0062] Os aditivos e/ou anticoagulantes podem ser dispostos no reservatório e/ou em qualquer outro lugar no dispositivo desde que eles entrem em contato com a amostra a fim de proporcionar o efeito pretendido. Por exemplo, estes ingredientes também podem ser dispostos na parede interior, tampas e lacres para fechamento de tais dispositivos ou em mecânicos ou outras inserções colocadas dentro destes dispositivos.

[0063] Os métodos da presente invenção incluem a introdução de sangue ou de uma amostra de sangue, no dispositivo que contém o agente de estabilização de sangue. Em algumas formas de realização da invenção, a amostra de sangue é retirada do paciente diretamente no recipiente sem quaisquer etapas intermediárias do processo. Em outras formas de realização, a amostra coletada é ainda processada para preparar uma composição como uma composição enriquecida contendo uma componente de sangue como o PRP.

[0064] A amostra pode então ser submetida a uma análise, por exemplo, teste de diagnóstico para medir um parâmetro de sangue. Em algumas formas de realização, o parâmetro que é medido é a função plaquetária, que pode ser avaliada pela capacidade das plaquetas contidas na amostra de se agregarem sob estímulo. Tal teste também pode ser realizado mesmo se a amostra (por exemplo, PRP)

destina-se a uso terapêutico.

[0065] Existem vários testes de diagnóstico *in vitro* que podem ser aplicados para analisar a função de plaquetas em amostras de sangue extraídas e composições que contém as plaquetas. Agregometria por transmissão de luz (LTA) é uma técnica amplamente utilizada. LTA baseia-se em medir a quantidade de luz que pode passar por uma preparação de plasma enriquecida em plaquetas (PRP). Em LTA, o elevado número de plaquetas no PRP dispersa fótons, mas mediante agregação estimulada pela adição de um agonista de plaquetas, as plaquetas aglutinam-se em massas que se tornam eventualmente tão grandes que caem para o fundo da câmara de teste. Durante todo o processo, a dispersão da luz é reduzida, e a agregação é medida como um aumento na quantidade de luz que pode passar através da amostra. Outro método é a agregometria de sangue total por impedância (WBIA), conforme descrito no exemplo 1 abaixo. Outra técnica relevante é incorporada no sistema VerifyNow vendido pela Accumetrics, que usa uma variação das medições de agregação que depende da agregação de plaquetas na superfície dos grânulos de látex revestida de fibrinogênio e a agregação é monitorada por alterações no sinal de absorvância. Um instrumento chamado PFA-100, comercializado pela Siemens, mede a função plaquetária pela análise de tempo necessário para a formação de trombos em um sistema modelo. PFA-100 utiliza um cartucho tendo uma pequena abertura através do qual o sangue pode ser puxado, e esta abertura é obstruída quando é induzida a agregação plaquetária, e a força necessária para tirar o sangue através da abertura aumenta como uma função da agregação. PFA-100 representa um método "físico", em que um resultado macromolecular da função plaquetária é medido, neste caso oclusão de uma abertura em um dispositivo. Outro método físico é a tromboelastografia, no qual a formação do coágulo, incluindo a agregação de plaquetas como parte integrante da massa do coágulo, é medida pela quantidade de resistência física de um pino em

movimento mergulhado na amostra, com a resistência aumentando conforme a massa de coágulo aumenta. Por outro lado, medidas de citometria de fluxo que podem ser feitas diretamente em células de plaquetas individuais, nas quais alterações moleculares específicas nas células podem ser medidas. Com o uso de citometria de fluxo, muitas alterações específicas que ocorrem durante a ativação plaquetária podem ser medidas, por vezes mesmo como precursores para a caracterização mais física de agregação nas medidas acima, tais como alterações na forma e orientação da superfície das proteínas, incluindo proteínas receptoras de superfície celular ou alterações no teor iônico de plaquetas (por exemplo, sabe-se que ocorre mudança na concentração de cálcio intracelular em consequência da ativação plaquetária). Além disso, a fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP), uma proteína fosforilada no interior de plaquetas, torna-se menos fosforilada em consequência da ativação do receptor P2Y12 na superfície de plaquetas, e, conseqüentemente, uma queda na fosforilação da VASP, que pode ser monitorada por citometria de fluxo, é indicativo de ativação plaquetária (ver, por exemplo, Geiger et al (2005) Clin. Chem. 51(6):957-965). Enquanto o estado de fosforilação da VASP pode ser medido no interior de plaquetas usando citometria de fluxo, métodos indiretos usando métodos mais tipicamente imunoquímicos para o mesmo fim também tem sido descritos.

[0066] Conforme ilustrado nos exemplos de trabalho, a capacidade e a extensão das plaquetas para se agregar pode também ser medida por meio de "agregometria" em amostras de sangue. Agregometria pode ser medida como "agregometria de sangue total por impedância" (WBIA), entre as várias maneiras de realizar agregometria. Uma vantagem do WBIA é que enquanto LTA requer preparação do PRP como amostra teste, WBIA pode funcionar em uma amostra de sangue total, mas também pode funcionar com PRP. Em WBIA, dois fios dentro de um copo especial de amostra são submersos em uma amostra de sangue

preparada, com uma separação muito pequena entre os fios, e uma pequena corrente elétrica é executada entre os fios (a corrente é conduzida através do sangue na pequena separação). Em consequência da estimulação química introduzida pelo operador, é iniciada a agregação plaquetária. As plaquetas preferencialmente se acumulam nas superfícies dos fios conforme se agregam e o crescente acúmulo de plaquetas começa a isolar-se contra a corrente elétrica, causando um aumento da impedância elétrica, que é gravada pelo instrumento. Um experimento típico coleta dados de corrente elétrica durante 6 minutos após a introdução do estimulante químico.

[0067] Estas medidas destinam-se a ser sensíveis ao grau de agregação de plaquetas (também referida, neste caso, como a função plaquetária) e, também, em certa medida, simplesmente para o número de plaquetas na amostra. Em algumas formas de realização, pode ser benéfica a indução de agregação de plaquetas em um tempo específico após a coleta. Assim, um agonista de plaquetas pode ser adicionado à amostra para induzir a agregação. Agonistas são geralmente conhecidos por pessoas versadas na técnica e podem incluir, por exemplo, colágeno, adenosina difosfato (ADP), ácido araquidônico (AA), epinefrina, peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP), peptídeos relacionados a colágeno (CRP), ristocetina, trombina (e análogos de trombina), agonistas do receptor de tromboxano (por exemplo, U46619), propil galato catiônico e convulxina. Em muitos casos, os agonistas de maior interesse são drogas projetadas para evitar o acúmulo não saudável de agregados de plaquetas, como será descrito mais detalhadamente em alguns dos exemplos que se seguem.

[0068] Há também um número de antagonistas, ou compostos que podem inibir a resposta plaquetária e seus efeitos que também podem ser medidos. Pelo modo de ação, estes compostos, conhecidos por pessoas hábeis na técnica, incluem inibidores da ciclo-oxigenase (p. ex., ácido acetilsalicílico (ASA, ou "aspirina")),

inibidores do receptor de tromboxano (p. ex., terutroban, sulotroban, ifetroban), antagonistas do receptor de trombina (PAR-1, vorapaxar, atopaxar), inibidores do receptor de GpIIb/IIIa (por exemplo, abciximab, tirofiban, eptifibatide), antagonistas do receptor P2Y₁₂ (por exemplo, clopidogrel (nome comercial Plavix), [ácido dicloro-[[[(2R,3S,4R,5R)-3,4-diidroxi-5-[6-(2-metilsulfaniletilamino)-2-(3,3,3-trifluoropropilsulfanil)purin-9-illoxolan-2-il]metoxi-hidroxifosforil]oxi-hidroxifosforil]metil]fosfônico (Cangrelor), ou (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-Difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentane-1,2-diol (Ticagrelor) e outros compostos que podem prejudicar a função bioquímica de plaquetas.

[0069] É vantajoso estabilizar as amostras de sangue extraídas e seus componentes para uma ampla variedade de testes de diagnóstico, bem como para uso terapêutico subsequente. A divulgação a seguir ilustra exemplos representativos destes utilitários, particularmente no contexto da preservação da função plaquetária.

[0070] Dada a natureza aguda de eventos cardiovasculares adversos, pode ser essencial saber que a primeira abordagem terapêutica selecionada para um paciente terá benefícios imediatos, idealmente sem ter que acompanhar os pacientes e ser forçado a selecionar terapias alternativas. Assim, antes de pacientes submeterem-se a essa terapia, eles muitas vezes têm amostras de sangue coletadas e testadas para a função plaquetária. Esses testes também podem ser recomendados para monitoração contínua do efeito dos antitrombóticos prescritos, testando para superinibição ou subinibição da função plaquetária. Testes semelhantes são frequentemente empregados para triagem pré-cirúrgica para excluir potenciais efeitos adversos de sangramento durante a cirurgia / recuperação. De maneira importante, o teste pode ser impreciso, se a função das plaquetas não é estabilizada na amostra de sangue extraído, permitindo que as mesmas se agreguem antes do teste (por exemplo, sem função "esquerda" para testar), ou

talvez "morram" ou, de outro modo, percam a função natural antes do teste.

[0071] Por exemplo, medicamentos antiplaquetários têm um uso muito elevado nos Estados Unidos e em todo o mundo. Tomar uma aspirina "infantil" diariamente para a saúde do coração tornou-se uma prática comum, com cerca de 50 milhões de americanos tomando uma dose diária de aspirina. Plavix (ou clopidogrel, pelo nome químico), é uma terapia antiplaquetária amplamente usada, usada em configurações agudas (por exemplo, imediatamente após procedimentos cardiológicos de Intervenção, ou em situações de emergência relacionadas a ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral) e para cuidado crônico de pacientes que tiveram complicações cardiopulmonares ou circulatórias. O mecanismo de ação do Plavix e aspirina, fundamentalmente, inibe a agregação plaquetária, que se destina, por exemplo, a reduzir a probabilidade de obstrução arterial de agregados de plaquetas espontaneamente formados que podem levar a ataque cardíaco ou derrame. Há mais de 29 milhões de prescrições anualmente para Plavix. Essas drogas funcionam bloqueando as vias químicas que induzem a agregação de plaquetas e assim pode ajudar a atenuar eventos cardiovasculares perigosos que podem ser agravados por agregados de plaquetas (trombos) que obstruem mecanicamente o fluxo de sangue arterial ou venoso. Possivelmente tanto quanto 50 por cento dos seres humanos não respondem bem a estas drogas – e um tema que tem sido de crescente interesse na literatura médica e científica atual (por exemplo, Tentzeris et al. *Thromb Haemost.* 105 Suppl 1:S60 - 6 (2011)). Pacientes que são "resistentes" a estas drogas não experimentam esta inibição plaquetária e, portanto, têm muito alto risco de eventos adversos. A primeira ou a única indicação de que estas drogas não funcionaram como previsto pode ocorrer quando o paciente realmente experimenta o ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral que a prescrição foi destinada a evitar.

[0072] Muito similares a Plavix e aspirina, inibidores de plaquetas

(agonistas) que imitam esses efeitos podem ser adicionados a uma amostra de sangue extraída para testar a eficácia sem necessariamente exigir que pacientes tomem a droga (antes da extração do sangue). Conforme descrito acima, um agonista pode ser adicionado que imita os diversos sinais químicos que podem ser induzidos no interior do corpo em consequência a danos para a vasculatura, e os efeitos dos antagonistas de plaquetas podem ser testados por sua capacidade de silenciar a resposta aos agonistas.

[0073] Em particular, a aspirina imediatamente inibe a função plaquetária, de modo que a simples adição de uma pequena quantidade de aspirina diretamente a uma amostra de sangue antes da análise de agregação de plaquetas pode permitir a determinação de se aspirina seria benéfica. Alguns dos inibidores P2Y12, tais como o cangrelor e ticagrelor, também podem se ligar diretamente às plaquetas e inibi-las e, portanto, podem ser adicionados diretamente em uma amostra de sangue antes do teste para a sua eficácia como inibidores de plaquetas.

[0074] Por outro lado, Plavix é um “pró-fármaco” que deve ser convertido em uma forma ativa por transformação metabólica após sua ingestão. Pró-fármacos são muitas vezes processados por enzimas no fígado, resultando em formas ativas que podem, então, circular no sangue. Como tal, a adição da forma ingerida (pró-fármaco) de Plavix a uma amostra de sangue extraída não resultará na inibição da agregação plaquetária. Entretanto, as ações de Plavix podem ainda ser imitadas para permitir testes sem que o paciente tenha antes que realmente tomar a droga. Plavix e outras drogas semelhantes agem inibindo a via que permite ao ADP estimular ou agonizar, plaquetas. O composto químico 2-Metiloadenosina 5'-monofosfato (2MeSAMP), inibe os mesmos alvos que Plavix e outros inibidores P2Y12 inibem *in vivo* (Srinivasan et al., J. Biol. Chem. 284(24):16108-17 (2009)), mas podem atuar diretamente em plaquetas, e então pode ser adicionado a uma amostra de sangue imediatamente antes do teste. Assim, a adição de um

antagonista de plaquetas como 2MeSAMP a uma amostra de sangue extraída antes do teste de agregação plaquetária permite a determinação de se Plavix seria terapeuticamente útil no paciente. O antagonista 2MeSAMP também fornece uma imitação adequada para os efeitos das drogas Cangrelor e Ticagrelor.

[0075] Testes de função plaquetária podem, portanto, fornecer uma maneira direta de medir se ou não estas drogas tem o efeito desejado sobre o paciente, por exemplo, extraíndo-se sangue e testando a função plaquetária antes e depois do início da terapia da droga. Se o paciente está respondendo adequadamente às drogas, a função plaquetária medida iria diminuir após a dose. O acompanhamento contínuo dos pacientes em terapia de longo prazo também pode ser realizado para garantir que a função plaquetária esteja sendo inibida a um nível suficiente para ajudar a prevenir o ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral, enquanto garante ao mesmo tempo que a função plaquetária não tem sido excessivamente inibida. Neste último caso, seria um risco muito alto ao paciente experimentar episódios hemorrágicos que não param (por exemplo, um estado similar a hemofilia induzida por drogas).

[0076] Um uso relacionado para esses testes está no contexto de triagem pré-operatória. Testes de função plaquetária inerente em pacientes antes da cirurgia podem identificar aqueles pacientes predispostos a eventos de sangramento adversos, de modo que a cirurgia poderia ser adiada ou a condição poderia ser tratada antes da cirurgia (ver, por exemplo, Bracey et al., *Am. J. Cardiol.* 98(10A):25N-32N (2006)). Por exemplo, pacientes seriam identificados como "em risco" se o potencial de agregação inerente de suas plaquetas fosse anormalmente baixo, como julgado por testes de agregometria.

[0077] Função plaquetária também pode ser conservada para fins de testes proteicos ou de biomarcadores metabólitos. As plaquetas contêm proteínas e metabólitos de interesse diagnóstico, mas o valor do ensaio é mais provável que

seja por medir a concentração das formas livremente circulantes destes biomarcadores no plasma. Acredita-se que a degranulação de plaquetas, especialmente como consequência da ativação ou agregação plaquetária, pode levar a níveis artificialmente elevados destes marcadores e representa um erro pré-analítico se não controlada. Da mesma forma, os grânulos de plaquetas também contêm enzimas que podem danificar estes biomarcadores em circulação e assim resultar em níveis artificialmente baixos de biomarcadores de interesse. Embora certos inibidores pudessem ser incluídos em um tubo de coleta de sangue para "interceptar" quaisquer enzimas que evoluam a partir de plaquetas ativadas, é desejável simplesmente impedir ativação plaquetária em primeiro lugar, para fornecer plaquetas estabilizadas para testar estes biomarcadores de origem plasmática.

[0078] Ainda um outro uso da presente invenção refere-se ao uso de plaquetas estabilizadas para uso em determinadas aplicações terapêuticas. Terapia de gel de plaquetas autólogas é um processo para o tratamento de certas feridas e uma grande variedade de outras condições que vão desde a cicatrização de implante dentário a injeções destinadas a reparar danos de ligamento. A premissa envolve a extração de uma amostra de plasma, isolando "plasma enriquecido em plaquetas" e então reintroduzir a preparação no paciente no local onde a cicatrização é desejada. Um método envolve a adição de trombina ou outro coagulante, para induzir a coagulação, resultando em uma "cola" que se forma rapidamente e pode ser aplicada no local para melhorar a cicatrização. Acredita-se que a degranulação plaquetária, que liberará citocinas e certos fatores de crescimento, estimule a cicatrização de feridas nesta abordagem de terapia autóloga. Se a função plaquetária é perdida, e como resultado, as plaquetas se tornam prematuramente ativadas, elas podem perder este efeito terapêutico. A coleta e/ou armazenamento de plaquetas na presença de agentes de estabilização

de sangue da presente invenção são, portanto, vantajosos também deste ponto de vista.

[0079] Além de análises de função plaquetária, outros parâmetros sanguíneos clinicamente relevantes podem ser medidos. Parâmetros sanguíneos representativos incluem medições de analitos provenientes do plasma que são comumente testados em química clínica, imunoquímica, enzimologia e outras medições de moléculas "fora" das células (na porção plasmática do sangue). Outros parâmetros de sangue incluem análises de célula, como hematologia, contagem de sangue completo (CBC), esfregaços de sangue e análise microscópica de células do sangue, medições de granulação/degranulação plaquetária e caracterização bioquímica e metabólica de células (frequentemente medidas, por exemplo, por citometria de fluxo, biologia molecular, proteômica). O sangue e amostras de sangue estabilizadas da presente invenção com estes agentes serão compatíveis e assim úteis com qualquer ensaio clínico padrão no qual anticoagulação é uma exigência de base da amostra de sangue. Por exemplo, testes hematológicos clínicos padrão como contagem de sangue completo (CBC), em que várias células em uma amostra de sangue são distinguidas e contadas, dependem de uma amostra com anticoagulantes, de modo que todas as células no estado suspenso/dissolvido de sangue total. Comumente, para fins de rotina CBC, sangue é estabilizado com EDTA. Quaisquer testes feitos em plasma obviamente exigem anticoagulação (ou a amostra coagularia e, em seguida, seria definida como soro). Medidas tradicionais de química clínica (um menu de algumas dezenas a centenas de analitos típicos bem conhecidos para pessoas versadas na técnica) são muitas vezes feitas com amostras de plasma anticoaguladas por heparina. Da mesma forma, Imunoquímica, ou quantificação dos analitos através do uso de ligação de anticorpo como o mecanismo de detecção, também se baseia em amostras de plasma. No entanto, EDTA e concentrações normalmente utilizadas de heparina (p. ex., 13 U/ml) ambos

interferem com a real capacidade de realizar testes de função plaquetária. Como tal, não há reciprocidade da aplicabilidade de plataforma cruzada de amostras. A presente invenção supera esta limitação na medida em que estabiliza as amostras de sangue para testes de função plaquetária, bem como outros testes hematológicos clínicos comuns.

[0080] Para facilitar o uso da presente invenção, um ou mais dos dispositivos podem ser embalados na forma de um kit. Em algumas formas de realização, o kit incluirá um ou uma pluralidade de dispositivos, por exemplo, organizados em prateleiras abertas ou em uma embalagem selada. Os kits também podem conter um ou mais elementos que são úteis na extração e coleta de sangue, por exemplo, agulhas, torniquetes, ataduras, álcool e toalhetes e lancetas. Kits também podem incluir outros tipos de dispositivos de coleta de sangue como tubos, que têm dispostos dentro deles agentes de estabilização de sangue conhecidos e/ou anticoagulantes, cujos exemplos incluem tubos com EDTA (por exemplo, para a contagem hematológica de rotina), tubos com heparina (para química clínica), tubos com citrato (para testes de coagulação) e outros tubos especiais (para uso em proteômica, genômica e similares). Os kits da presente invenção podem também incluir instruções para uso.

[0081] Em algumas outras formas de realização, o kit pode incluir um dispositivo de coleta primário, por exemplo, um tubo de plasma com um tubo de separação de plasma com um elemento de separação, e um tubo secundário para teste, por exemplo, para derramar ou de outra forma, dispensar o plasma coletado. O elemento de separação no tubo primário pode ser de uma densidade adequada para permitir o isolamento do plasma enriquecido em plaquetas a partir de outro teor celular do sangue. O tubo de teste secundário pode ser de tamanho igual ou diferente do que o tubo primário, dependendo do teste desejado. Ambos os tubos podem ter um agente de estabilização de plaquetas disposto dentro deles. O kit

ainda pode incluir um dispositivo de transferência tubo a tubo para evitar a necessidade de derramamento ou outras práticas de transferência inseguras, caso em que o tubo secundário teria uma pressão reduzida para extração no plasma.

[0082] Em outro aspecto da invenção, um antagonista de plaquetas pode ser incluído no tubo primário de coleta de sangue, juntamente com o agente de estabilização do sangue. O teste de função plaquetária de uma amostra, por estímulo com um agonista apropriado, como parte de um ensaio de diagnóstico *in vitro*, pode refletir diretamente a eficácia do antagonista/droga no sangue do paciente. Em uma forma de realização preferida, um kit pode conter pelo menos dois tubos, um tubo que contém o agente de estabilização do sangue, e outro tubo que contém o agente de estabilização do sangue e o antagonista de plaquetas, assim permitindo que o operador meça as plaquetas em ambos os estados inibidos e não inibidos sem ter que realizar qualquer outra manipulação de amostras de sangue antes de realizar o ensaio de agregação.

[0083] A invenção será agora descrita em termos dos seguintes exemplos não limitantes.

Exemplo 1: Estabilidade prolongada de uma amostra de sangue total para testes de função plaquetária, como refletido por medições de agregação plaquetária.

[0084] Amostras de sangue: sangue venoso foi extraído de um sujeito humano para tubos contendo citrato de sódio (3,2%) ou 150µM de variegina (SEQ ID NO: 1). O sangue permaneceu em temperatura ambiente, em alíquotas não perturbadas, até ser testado nos tempos indicados. As amostras foram invertidas várias vezes imediatamente antes do teste, para ressuspender as células sanguíneas que naturalmente precipitam ao longo do tempo.

[0085] Medidas: Testes de função plaquetária (que, neste experimento, foi atividade de agregação) foi feito utilizando o instrumento Multiplate (Verum Diagnostics, Munique, Alemanha), que usa sangue total como amostra e um

aumento da impedância como medida de agregação plaquetária. O instrumento foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 300 microlitros de solução salina isotônica foram aquecidos em cada cubeta de reação e para isto foi adicionado 300 microlitros de amostra de sangue total. Nas reações em que aspirina ou outros antagonistas de plaquetas (inibidores) foram adicionados *in vitro*, 20 microlitros (μL) de uma solução estoque de aspirina foi adicionada às amostras. A reação de agregação foi iniciada pela adição de um agonista de plaquetas, neste caso colágeno, à 3,2 $\mu\text{g/ml}$ e volume (20 μl) de acordo com as instruções do fabricante. Após a adição de colágeno, as medições de impedância começaram automaticamente e continuaram por 6 minutos, representando o curso completo ao longo do eixo x nos gráficos mostrados na figura 2. Os gráficos mostram agregação de plaquetas, conforme relatado por impedância, como uma medida arbitrária sem unidade sobre o eixo-y, durante o tempo de corrida de 6 minutos no eixo x. Traços mostrados são dados de agregação de plaquetas brutos liberados do instrumento. Os traços duplicados evidentes em alguns dos gráficos representam dois canais de medições duplicadas que sempre correram simultaneamente, para auxiliar com a significância estatística dos dados, e muitas vezes se sobrepõem tão intimamente que parecem apenas um único traço em alguns gráficos. Dados representativos são mostrados para o sangue que permanece em temperatura ambiente após o início da extração por 1 hora, 24 horas, 48 horas e 72 horas. Dados são mostrados para o sangue, bem como para sangue pré-tratado com aspirina para inibir a função plaquetária, imediatamente antes do teste.

[0086] De acordo com os órgãos reguladores de diagnósticos como o Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI), sangue total com citrato é considerado o padrão clínico para uso em testes de função plaquetária. Assim, comparou-se as modalidades inventivas contra citrato. Como mostrado na Figura 2, o citrato e as amostras inventivas quando frescas, por uma hora, funcionaram de

forma análoga. Ambos responderam fortemente ao colágeno e mostraram o antagonismo mensurável por aspirina. No entanto, a força do sinal para a modalidade inventiva foi maior do que a amostra de referência com citrato, mesmo na amostra "fresca", demonstrando as vantagens da presente invenção para teste mesmo dentro as atuais diretrizes clínicas que recomendam testes de sangue com citrato no prazo máximo de 2-4 horas após a extração de sangue. A exposição imediata de sangue à química da invenção tem um benefício mensurável. Por muito tempo ficou claro que o sinal de sangue com citrato era claramente perdido, resultando em um sinal quase não mensurável e assim tornando qualquer observação de diminuição adicional pelo antagonista aspirina essencialmente impossível. Por outro lado, em 24 e 48 horas, a modalidade inventiva preservou a função plaquetária substancialmente no nível da função medida na amostra 1h mais velha e também preservou a capacidade de medir o antagonismo da aspirina. Em 72 horas, o sinal foi ligeiramente reduzido, mas ainda suficientemente forte para ainda permitir a observação de diminuição adicional quando adicionou a aspirina. Assim, os resultados deste experimento demonstram aspectos benéficos da presente invenção, ou seja, um sinal de função plaquetária plaqueta mais forte com amostras frescas, bem como uma função de plaquetas extremamente preservada até vários dias após a extração, permitindo também que o sangue ser armazenado simplesmente à temperatura ambiente.

Exemplo 2: Extensão do tempo útil de uma amostra de sangue extraída para medições de função plaquetária.

[0087] Fig. 3 ilustra as limitações dos métodos de medição de função plaquetária, e como a perda de função após uma amostra ser extraída afeta negativamente a capacidade de gerar dados úteis de diagnósticos clínicos. Os experimentos foram realizados conforme descrito no exemplo 1. Neste caso, os dados são plotados em função do tempo que a amostra de sangue permanece fora

do corpo (eixo x) versus função plaquetária como mostrado como a área sob a curva (AUC) como uma representação do sinal de agregação plaquetária. AUC é o sinal integrado a partir de traços de dados brutos mostrados no Exemplo 1, e também é relatado como uma medição sem unidade. O nível basal eficaz do instrumento é desenhado como uma linha tracejada ao longo da parte inferior do gráfico. Qualquer medida de AUC de agregação igual ou inferior a este nível foi considerada muito fraca para ser relatada, essencialmente representando um nível de dados "nulo".

[0088] Em 24 horas, tornou-se evidente que as plaquetas em amostra de sangue com citrato perderam função suficiente quanto a estarem muito perto do nível de eficácia nulo e na presença de aspirina já tinha atingido este nível nulo. Por 48 horas, mesmo na ausência de aspirina adicionada, nenhuma agregação significativa foi detectada para a amostra com citrato. Por comparação, a modalidade inventiva estabilizou a função plaquetária permitindo medições significativas mesmo em 72 horas após a extração de sangue.

[0089] Ainda outro ponto de vista dos dados é representado na Fig. 4, em que a agregação de plaquetas medida para cada tipo de amostra é relatada como uma porcentagem em relação à agregação medida para amostras de 1 hora. Dados neste gráfico são relatados como uma média de três seres humanos, com as barras de erro, representando um desvio padrão da média. Nesta perspectiva, os dados mostram que, dentro de 24 horas, as plaquetas coletadas e armazenadas com citrato perdem bem mais da metade de sua função e por 48 horas, perdeu mais de 80% da função. Por comparação, a partir de 48 horas, bem mais da metade do sinal foi mantido para plaquetas coletadas e armazenadas com a modalidade inventiva.

EXEMPLO 3: Efeito de diferentes concentrações de variegina na preservação de função plaquetária e anticoagulação.

[0090] A estabilidade relativa das plaquetas foi examinada com relação a uma gama de concentrações de variegina (SEQ ID NO: 1). Experimentos foram

realizados conforme descrito acima, usando colágeno ou adenosina difosfato (ADP) como agonistas, todos de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante. A tabela 2 lista uma avaliação qualitativa da estabilidade, ou seja, quanto tempo após o início da extração de sangue foi mensurável acima da linha de base eficaz do instrumento, o tempo para a primeira observação visual de coagulação, material insolúvel na amostra de sangue total, e uma avaliação da gravidade ou extensão da presença deste material insolúvel foi também registrada.

Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações de variegina (SEQ ID NO: 1), na estabilidade plaquetária e qualidade de amostra de sangue.

Modalidade inventiva	Tempo após a extração de sangue em que a agregação era ainda mensurável acima da linha de base	Inspeção visual para material insolúvel
150 µM variegina	72 h ou mais	Traços em 48-72h. Coágulos sólidos por 96h
75 µM variegina	48-72 h	Traços de coágulos por 32h
50 µM variegina	24 h	Moderado em 24h, extensivamente coagulado por 48h
15 µM variegina	24 h	Moderado em 24h, coagulado por 48h
2 µM variegina	2 h	Coágulos sólidos em 7h

[0091] Os resultados mostram que os aumentos nas concentrações de variegina resultaram em geral em um efeito geral de preservação (estabilização) de função mais longo, tanto em termos de ter sinais de agregação plaquetária mensuráveis quanto no atraso do aparecimento de material insolúvel na amostra de sangue total.

[0092] Os resultados também mostram que o uso da presente invenção pode ser personalizado e adequado para exigências de uso específico. Por exemplo,

em uma situação onde uma amostra pode precisar ser recolhida e testada rapidamente, como em um departamento de emergência de hospital, é possível obter várias horas de estabilidade usando concentrações relativamente baixas (por exemplo, 2 μM) do agente de estabilização do sangue, como variegina. Quando tempos de estabilização maiores são necessários, como em situações onde testes serão feitos possivelmente vários dias após a coleta, os resultados mostram que o uso de concentrações relativamente maiores (por exemplo, 150 μM) do agente de estabilização de sangue como variegina é benéfico. Em conjunto com os benefícios da presente invenção sobre citrato, a presente invenção pode fornecer vantagens de sinais de agregação plaquetária mais fortes através de uma gama de prazos por seleção de uma concentração adequada do agente de estabilização de sangue.

EXEMPLO 4: Efeito da variegina e outras variações do peptídeo variegina na preservação de função plaquetária e outros aspectos da qualidade da amostra.

[0093] Foram realizados experimentos testando vários análogos de variegina (SEQ ID NO: 1). A tabela 3 lista os peptídeos que foram testados, os quais foram produzidos por síntese de fase sólida típica.

Tabela 3: sequências de variegina e variantes

Peptídeo	Número da sequência	Sequência
Variegina (comprimento de resíduo total 32)	1	SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES
Variegina Nt29*	2	SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLD
Variegina Nt26	3	SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEE
Variegina Ct29	4	GDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES
Variegina Ct22	17	MHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES
Variegina K10A	6	SDQGDVAEPAMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES

Nomenclatura: Abreviação de Nt representa aminoácidos amino-terminais, com o número que representa o número do resíduo onde se inicia o amino-terminal.

Ct representa todos os aminoácidos carboxi-terminais, numerados da mesma forma que os amino-terminais. K10A é uma variante de resíduo único, de acordo com a nomenclatura de sequência de proteínas padrão.

[0094] Estes peptídeos foram usados como agentes de estabilização do sangue e foram adicionados em sangue imediatamente após a coleta em um tubo de coleta de sangue vazio, evacuado, atingindo uma concentração final de 150µM. O sangue foi mantido no conjunto à temperatura ambiente, até ser ensaiado para seu potencial de agregação de plaquetas, tudo conforme descrito no exemplo 1. Os agonistas utilizados foram colágeno e ADP, de acordo com as instruções do fabricante. A tabela 4 lista uma avaliação qualitativa da estabilidade, ou seja, quanto tempo após o início da extração de sangue foi mensurável a agregação plaquetária acima da linha de base eficaz do instrumento. Além disso, o tempo para a primeira observação visual de coagulação, material insolúvel em amostra de sangue total e uma avaliação da gravidade ou extensão da presença deste material insolúvel também foi registrado. Em alguns casos, foi relatada somente a caracterização visual da quantidade de material insolúvel, sem ter realizado quaisquer medições de agregação plaquetária.

Tabela 4: Variantes de varieggin e seus efeitos na preservação da função plaquetária e estabilidade da solubilidade (anticoagulação) das amostras.

Peptídeo, concentração	Tempo após a extração de sangue em que a agregação era ainda mensurável acima da linha de base	Inspeção visual para material insolúvel
150µM varieggin (SEQ ID NO:1)	72 h	Quantidades traços de material insolúvel em 48-72h.
150µM Nt29 (SEQ ID NO:2)	n.d.	Traços de material insolúvel em 32h
150µM Nt26 (SEQ ID NO:3)	n.d.	Traços de material insolúvel em 7h, solidamente coagulado por 24h

150µM Ct29 (SEQ ID NO:4)	54-79 h	Traços de material insolúvel em 48h
150µM Ct29 + 1.17 U/ml heparina	48 h (não medido após 48h)	Nenhum ou traços insolúveis por 120 h
150µM Ct22 (SEQ ID NO:5)	n.d.	Traços de coagulação sólida em apenas 1h
150µM K10A (SEQ ID NO:6)	n.d.	Coágulos sólidos por 4h

[0095] Como indicado pelos dados, o encurtamento da sequência de variegina resultou em menor duração da estabilidade da amostra, especialmente quando julgadas pelo tempo de permanência em temperatura ambiente até que uma quantidade visualmente detectável de material insolúvel foi formado na amostra de sangue total. No entanto, sequências de variegina encurtadas podem ser usadas para alcançar a preservação da função plaquetária em situações onde tempos mais curtos para estabilidade de amostras como um todo poderiam ser suficientes, como no hospital ou em situações de departamentos de emergência onde testes de plaquetas podem ser realizados relativamente logo após a extração de sangue.

[0096] Dois destes análogos de variegina (SEQ ID NOs: 6 e 16) foram usados para examinar as habilidades de preservação de função plaquetária dos produtos, quando variegina é, finalmente, clivada pela trombina. Variegina compete pela ligação do sítio ativo da trombina e, como tal, está-sujeito a clivagem pela trombina (Koh et al., J. Biol. Chem. 282(40):29101 - 13 (2007)). Além disso, mutação de resíduo cindível, a lisina na posição 10, para uma alanina, bloqueia a capacidade de trombina de clivar o peptídeo designado como SEQ ID NO: 6, que resultou em amostras coaguladas sólidas dentro de 4 horas depois de extrair o sangue. Da mesma forma, a adição de Ct22, que representa apenas os 22 resíduos carboxi-terminais que resultam após a trombina ter clivado variegina, resulta em uma amostra quase inútil que coagula solidamente dentro de uma hora, essencialmente o que aconteceria se nada fosse adicionado ao sangue e fosse permitido coagular por

conta própria após flebotomia.

[0097] Estes resultados são inconsistentes com os resultados relatados em Koh, que relata que Ct22, em particular, é um inibidor de trombina eficaz para fins terapêuticos, como medido por experiências enzimológicas tradicionais. Os presentes resultados tomados neste contexto, sublinham a imprevisibilidade no estado da técnica no sentido de que a extensão da inibição da trombina para fins terapêuticos não é necessariamente preditiva de (ou não necessariamente se correlaciona com) inibição da trombina para fins de estabilização de sangue e seus componentes como plaquetas sob condições não fisiológicas tais como em uma amostra de sangue coletada.

[0098] Os dados também mostram que a combinação de Ct29 e 1,17U/mL de heparina prolonga as horas de estabilidade da amostra.

EXEMPLO 5: Exame da preservação da função plaquetária, fornecida por outros inibidores diretos ou indiretos de trombina.

[0099] Alguns inibidores diretos ou indiretos da trombina foram avaliados por sua capacidade de estabilizar as amostras de sangue, preservando a função plaquetária, sozinho ou em combinação com outros inibidores. Foram realizadas medidas de agregação plaquetária, conforme descrito nos exemplos anteriores, usando colágeno e/ou ADP como agonista de plaquetas, e seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante.

[00100] Em adição a variegina, inibidores diretos da trombina examinados foram argatrobana, FM-19, aprotinina e D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina clorometil cetona (PPACK).

[00101] Inibidores indiretos da trombina examinados foram heparina e octasulfato de heparina e octasulfato de sacarose (SOS).

[00102] Todos os inibidores foram testados para sua capacidade de preservar a função de plaquetas em amostras de sangue coletadas, sozinhas ou em

combinação com variegín (SEQ ID NO: 1).

[00103] Os resultados são mostrados na tabela 5 que lista aditivos sozinhos ou em combinação que foram adicionados a amostras de sangue total recentemente coletadas. Três parâmetros de desempenho são relatados na tabela, ou seja: 1) o maior tempo após a extração de sangue em que uma medida de agregação plaquetária confiável poderia ser feita acima da linha de base do agregômetro; 2) o tempo mais curto em que se observou a detecção visual de material insolúvel (que inclui uma descrição qualitativa do grau de insolubilidade, como traço (baixo nível de material detectável, exigindo cuidadosa observação visual) ou quantidades moderadas (facilmente visto mediante avaliação superficial) e, em seguida, amostras totalmente coaguladas (solidificadas como com qualquer amostra de soro não perturbada e geralmente não utilizável de nenhuma forma para medições de agregação plaquetária); e 3) uma estimativa qualitativa de hemólise, conforme determinado visualmente, que é uma prática comum e aceita em laboratórios clínicos. Para algumas das condições testadas, registrou-se somente um subconjunto destes três parâmetros.

Tabela 5

	Receita aditiva	Tempo após a extração de sangue em que a agregação era ainda mensurável acima da linha de base	Inspeção visual para material insolúvel	Inspeção visual para hemólise
A	150µM variegín	72 h	Traços a 48-72h. Coágulos sólidos por 96h	Nenhum-leve
D	150µM variegín + 1,17/ml unidades USP de heparina não fracionada	72-96 h	Traços a 72-96h.	Nenhum-leve

E	150µM variegin + 1mM SOS		Trace em 72h	Nenhum-leve
F	150µM variegin + 1mM SOS + 1,17 U/ml heparina		Nenhum em 72h	Nenhum-leve
G	30µM Trombostatina (FM-19)	Não determinado	Solidamente coagulado por 24h	Nenhum-leve
H	150µM variegin + 30µM Trombostatina (FM-19)	72 h	Traço em 72h	Nenhum-leve
I	2mM SOS	72 h	Nenhum em 96h	Nenhum-leve
J	150µM variegin + 2mM SOS	72 h	Nenhum em 96h	Nenhum-leve
	Argatrobana, 100µM + variegin 150µM	48 h	Traço em 48h	Extenso
	Argatrobana, 100µM	24 h	Moderado em 24h, coágulo sólido se iniciando em 32h	Extenso
	Argatrobana, 50µM + variegin 150µM	48h	Traço em 48h	Nenhum

	Argatrobana, 50µM	30h	Moderado ou pior por 30h	Leve-moderado
	Argatrobana, 75µM + variegin 150µM	72h	Traço por 72-96h	Leve por 32h
	Argatrobana, 75µM	24h	Moderado em 24h, coágulos sólidos a partir de 32h	Moderado- extenso
	Aprotinina 500 KIU/mL + variegin 150µM	48 h	Traço a moderado em 24h, coágulos sólidos em 48h	Nenhum-leve

	PPACK 75µM	n.d.	Coágulos sólidos em 24h	
	PPACK 75µM + variegin 150µM	48 h	Traço em 32h, coágulos sólidos em 48h	

[00104] Como mostrado na tabela 5, 150 µM de variegin e 2mM de SOS, isoladamente e em combinação, provou ser eficaz com relação a todas as três medições de desempenhos. Estas formas de realização da presente invenção alcançou longos tempos de estabilidade (isto é, pelo menos 72 horas) e na maior parte na ausência de atributos menos desejáveis de formação de matéria insolúvel e hemólise.

[00105] Em contraste, vários dos inibidores diretos da trombina quando usados sozinhos, nas concentrações recomendadas ou nas concentrações relatadas como terapeuticamente úteis, forneceram pouco ou nenhum benefício de estabilização. Em particular, FM-19, CTI e PPACK resultaram em extenso material insolúvel, se não coagulação sólida completa dentro de 24 horas após a extração de sangue. Da mesma forma, o uso de concentração relativamente alta de argatrobana resultou em um início mais rápido da coagulação e menos tempo para estabilidade da amostra para medições de agregação de plaquetas, assim como grande quantidade de hemólise. Também, heparina, usada sozinha em 1,17U / ml, que é aproximadamente um-treze avos (1/13) da dosagem em uma amostra de plasma de heparina típica, teve desempenho relativamente ruim (dados não mostrados).

[00106] Estes resultados ainda sublinham a imprevisibilidade com relação ao uso de inibidores de trombina conhecidos e anticoagulantes para estabilização de sangue (por exemplo, preservando função plaquetária) *in vitro* e, portanto, são consistentes com hipóteses de trabalho dos Requerentes que a estabilização de sangue e particularmente a coagulação de sangue, pelo menos no contexto de uma amostra de sangue *in vitro*, tem um conjunto de exigências biológicas / bioquímicas diferente e talvez mais complicada, em comparação com a avaliação destes inibidores contra sistemas mais simples, como estudos de inibição da trombina

purificada sem a presença do resto dos componentes do sangue. Além disso, muito do que foi estudado sobre inibidores diretos da trombina afetam a potencial eficácia terapêutica para o tratamento de distúrbios de coagulação, mas, o mais importante, é que tais estudos e, finalmente, os fatores bioquímicos subjacentes associados com a realização de uma dose terapêutica bem sucedida não são necessariamente relevantes ou prognósticos com relação à sua capacidade de estabilizar componentes do sangue, como plaquetas em uma coleta, especialmente por um período de muitas horas ou dias. Dito de outra forma, só porque um agente é conhecido para uso medicinal como um inibidor da trombina, na identidade e as concentrações adequadas de eficácia, não significa necessariamente que ele funcionará como um agente de estabilização eficaz do sangue para fins de testes *in vitro*.

[00107] Por outro lado, os resultados mostram que apesar destes outros agentes terem sido pouco eficazes ou quase ineficaz quando usados sozinhos, eles forneceram um efeito de estabilização de plaquetas adicional quando utilizados em combinação com realizações inventivas - variegina e SOS. Por exemplo, no caso de heparina com variegina, temos observado tempos mais longos de medidas de estabilidade de agregação e redução ou atraso na formação de material insolúvel da amostra de sangue total. Observações semelhantes foram feitas com FM-19 em combinação com variegina. Para FM-19 e SOS, a combinação com variegina também foi visto um ligeiro aumento do sinal de agregação plaquetária total medido, ao longo do período total dos experimentos. Assim, os resultados observados mostram que as atividades e, em última análise, os benefícios adicionais fornecidos por estes inibidores (que, em muitos casos, eram conhecidos por exercer seu efeito de ligação à mesma região da trombina), quando utilizados *in vitro* para estabilizar as amostras de sangue extraídas, eram diferentes de suas atividades em sistemas de modelos enzimológicos projetados para avaliar seu real potencial inibitório para fins

terapêuticos.

EXEMPLO 6: Comparação entre modalidade inventiva e hirudina.

[00108] Analisou-se a estabilidade relativa das plaquetas no sangue que foi coletado de 5 diferentes seres humanos usando um tubo de coleta de sangue inventivo contendo 150µM de variegina (SEQ ID NO: 1) + 1,17 USP/mL de heparina não fracionada e, a título de comparação, tubos de coleta de sangue contendo hirudina, comercialmente disponível do Verum Diagnostica (catálogo #MP0600 para "Tubo de coleta de sangue à vácuo hirudina"). Experimentos foram realizados conforme descrito acima no exemplo 1, usando o agregômetro de impedância de sangue total e uma dose baixa de ADP (concentração final de 1,25 µM) como o agonista.

[00109] Como mostrado na tabela 6, as medidas de função plaquetária foram mais fortes no tubo de coleta inventivo do que nas amostras comparativas não inventivas de hirudina, imediatamente e após 24 horas.

Tabela 6: Medições de agregação plaquetária usando baixa dose de agonista ADP.

		Agregação, AUC	
		Tubo inventivo	Hirudina
0 hr	Sujeito 1	58	34
	Sujeito 2	51	18
	Sujeito 3	88	84
	Sujeito 4	120	113
	Sujeito 5	67	59
24 hr	Sujeito 1	32	27
	Sujeito 2	26	15
	Sujeito 3	33	25
	Sujeito 4	32	22
	Sujeito 5	44	37

[00110] Com sangue fresco, testado dentro de uma hora da extração, a agregação de plaquetas induzidas por ADP mensurável foi em média 56% superior

para o sangue no tubo de coleta sangue inventivo do que no tubo de coleta de sangue contendo hirudina. Estas mesmas amostras em 24 horas mostraram uma média de atividade 38% maior para a mesma comparação. As amostras com hirudina também mostraram uma distribuição mais ampla no tempo zero do que a formulação inventiva. As 5 amostras com hirudina mostraram agregação de 62 ± 38 , que representa um erro padrão de cerca de 61% ($38/62 * 100$). Por outro lado, a agregação no tubo inventiva foi de 77 ± 28 , para um erro-padrão de apenas 36%. Estes resultados demonstram que o uso de dispositivos de coleta de sangue inventivos alcançam uma resposta mais uniforme em toda uma população de amostra humana com reprodutibilidade do ensaio melhorada. Essas vantagens levam a melhor utilidade clínica para medições de função plaquetária. Por exemplo, fazendo um intervalo menor de "normal" para uma população saudável, amostras com pouca agregação, que podem refletir doenças ou má resposta à medicamentos antiplaquetários, podem ser mais fácil de detectar.

[00111] A modalidade inventiva, variegina, como a hirudina, é um peptídeo obtido de animais que se alimentam de sangue. Mais uma vez, no entanto, os dados demonstram que tais inibidores diretos de trombina derivados naturalmente, como uma classe, não tem igual, ou em alguns casos, eficácia semelhante a aditivos de sangue, particularmente para análises de função plaquetária e que suas capacidades neste sentido não são previsíveis.

[00112] Também é importante considerar outras maneiras em que dados como aqueles da tabela 6 poderiam ser utilizados. Por exemplo, seria esperado que a introdução de antagonistas de plaquetas reduziria extensivamente sinais não antagonizados, como relatado na tabela 6, pelo menos nos casos de pacientes que são adequadamente responsivos às drogas/antagonistas. Antagonistas relevantes incluiriam medicamentos antiplaquetários como aspirina, Plavix e outros já discutidos. A partir de experimentos anteriores pode-se observar que a adição de

2MeSAMP pode resultar em tanto quanto 50% ou mais, por exemplo, 67% (cerca de 2/3) de agregação plaquetária induzida por agonistas, o que resulta em um sinal baixo que pode revelar dificuldade para medidas confiáveis acima do limite inferior de detecção de um instrumento de agregação. Qualquer medida na presença de 2MeSAMP que caia perto ou abaixo deste limite inferior operacional não pode ser medido. Em termos de aparelho usado nesses experimentos, o limite inferior do sinal confiável é na faixa de 8 ou 9 AUC. Assim, pelo menos para fins do instrumento particular usado para realizar este experimento, uma medida de agregação induzida por ADP não antagonizado de pelo menos cerca de 27 AUC pode ser considerada o sinal mínimo de confiança (uma queda de 67% de 27 AUC seria 9 AUC, que está no limite de detecção deste instrumento particular). Assim, o limiar de 27 AUC é uma medida que os dados na tabela 6 deveriam ser julgados contra.

[00113] Em uma das cinco amostras de hirudina, a área sob a curva para a amostra de 1h foi medida como 18, caindo abaixo deste limiar funcional de 27 e assim resultaria em uma leitura não mensurável clinicamente na presença de 2MeSAMP. Em 24h, três das cinco amostras de hirudina caíram abaixo de 27 AUC, e uma quarta foi exatamente a 27.

[00114] Por outro lado, todas as cinco amostras coletadas no tubo de coleta de sangue inventivo mantiveram agregação de plaquetas bem acima do limiar de 27 no tempo de 1h, e quatro de cinco em 24h. Estes resultados demonstram que a presente invenção estabiliza as plaquetas durante a coleta e posterior armazenamento o que facilita a determinação inequívoca de dados de função plaquetária clinicamente relevantes, especialmente em casos onde é importante medir com precisão baixos níveis de agregação, melhorar a probabilidade de dados utilizáveis de medição ao longo do tempo (como sobre hirudina em amostras frescas e amostras armazenadas por 24 h).

[00115] Todas as publicações de patentes e publicações não patentárias são

indicativas do nível de habilidade das pessoas hábeis na técnica a qual esta invenção pertence. Todas estas publicações são aqui incorporadas por referência na mesma extensão como se cada uma das publicações individuais fossem especificamente e individualmente indicadas como sendo incorporadas por referência.

[00116] Embora a invenção tenha sido aqui descrita com referência a modalidades particulares, é entendido que estas modalidades sejam meramente ilustrativas dos princípios e aplicações da presente invenção. É, portanto, para ser entendido que inúmeras modificações podem ser feitas nas modalidades ilustrativas e que outros arranjos podem ser concebidos sem abandonar o espírito e o escopo da presente invenção, conforme definido pelas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo para coleta e estabilização de sangue ou de um componente do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dispositivo tem uma primeira extremidade e uma segunda extremidade e pelo menos uma parede interior definindo uma porção de reservatório para receber sangue, em que o reservatório contém um agente de estabilização de sangue compreendendo variegina tendo a sequência de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo, em que o fragmento é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-5 e análogos de tais fragmentos, os fragmentos análogos são selecionados do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 6-16, isoladamente ou em combinação com um dissacarídeo polissulfatado, cada um em uma quantidade eficaz para estabilizar plaquetas no sangue coletado pelo dispositivo, em que o variegina pode estar presente no dispositivo em uma concentração de 1 μ M a 1 mM, e em que o dissacarídeo polissulfatado pode estar presente no dispositivo em uma concentração de 50 μ M a 50 mM.

2. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é estéril e evacuado e compreende ainda uma tampa perfurável por uma agulha.

3. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é um tubo.

4. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende um separador.

5. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de estabilização de sangue ainda compreende um inibidor direto de trombina tal como argatroban, rOicPaF(p-Me)-NH₂, hirudina, bivalirudina, aprotinina, D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina (PPACK) ou combinações de dois ou mais dos mesmos.

6. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de estabilização de sangue ainda compreende um inibidor indireto da trombina selecionado do grupo consistido em heparina e heparinas de baixo peso molecular.

7. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de estabilização de sangue está na forma seca.

8. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda um anticoagulante, tal como anistasina; argatroban; E-76; antitrombina III; inibidores do fator Xa, tais como 6-(4-{1-[(dimetilamino)metil]ciclopropil}fenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1,4,5,6-tetrahydro-7H-pirazol[3,4-c]piridin-7-ona; 1-(4-metoxifenil)-6-[4-[1-(pirrolidin-1-ilmetil)ciclopropil]fenil]-3-(trifluorometil)-4,5-dihidropirazolo[3,4-c]piridin-7-ona ou combinações dos mesmos; inibidores do fator VII; inibidores do fator IX; inibidores do fator XII e inibidores do fator II, e combinações de dois ou mais dos mesmos.

9. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a formulação compreende ainda um antagonista de plaquetas, tal como um inibidor da ciclo-oxigenase, um inibidor de P2Y12, um anticorpo antiplaquetário e combinações de dois ou mais dos mesmos.

10. Uso de um dispositivo para estabilização de sangue ou de um componente de sangue do mesmo que é introduzido no dispositivo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dispositivo compreende uma primeira extremidade e uma segunda extremidade e pelo menos uma parede interior definindo uma porção de reservatório para receber o sangue ou a composição, em que o reservatório contém um agente de estabilização de sangue compreendendo variegina tendo a sequência de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 1, um fragmento do mesmo, em que o fragmento é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-5 e análogos de tais fragmentos, os fragmentos análogos são

selecionados do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 6-16, isoladamente ou em combinação com um dissacarídeo polissulfatado, preferivelmente octassulfato de sacarose, cada um em uma quantidade eficaz para estabilizar plaquetas no sangue coletado pelo dispositivo, em que o varieggin pode estar presente no dispositivo em uma concentração de 1 μ M a 1 mM, e em que o dissacarídeo polissulfatado pode estar presente no dispositivo em uma concentração de 50 μ M a 50 mM.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição é uma amostra de sangue extraída, ou em que a composição compreende plaquetas, tais com plasma rico em plaquetas (PRP) ou em que a composição compreende células sanguíneas brancas.

12. Uso de um dispositivo para medir um parâmetro de sangue ou de um componente do sangue *in vitro* que é introduzido no dispositivo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dispositivo compreende uma primeira extremidade e uma segunda extremidade e pelo menos uma parede interior definindo uma porção de reservatório para o recebimento de sangue ou de uma composição compreendendo um componente de sangue, em que o reservatório contém um agente de estabilização de sangue compreendendo varieggin tendo a sequência de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 1, um fragmento do mesmo, em que o fragmento é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-5 e análogos de tais fragmentos, os fragmentos análogos são selecionados do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 6-16, isoladamente ou em combinação com um dissacarídeo polissulfatado, preferivelmente octassulfato de sacarose, ou uma combinação dos mesmos, cada um em uma quantidade eficaz para estabilizar plaquetas no sangue coletado pelo dispositivo, em que o varieggin pode estar presente no dispositivo em uma concentração de 1 μ M a 1 mM, e em que o dissacarídeo polissulfatado pode estar presente no dispositivo em uma concentração de 50 μ M a 50 mM.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de

que o parâmetro de sangue é função plaquetária conforme medida pela agregação de plaquetas, e em que o dispositivo compreende ainda um agonista de plaquetas que estimula a agregação das plaquetas, em que o agonista pode compreender colágeno, adenosina difosfato (ADP), ácido araquidônico (AA), epinefrina, peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP), trombina, peptídeo relacionado ao colágeno (CRP), ristocetina, análogos de trombina, agonistas do receptor de tromboxano, propil galato catiônico e convulxina, e combinações de dois ou mais dos mesmos.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dispositivo ainda compreende um antagonista de plaquetas que inibe a agregação das plaquetas, em que o antagonista de plaquetas pode ser selecionado do grupo consistindo em ácido acetilsalicílico, clopidogrel, cangrelor, ticagrelor e 2-metiloadenosina 5'-monofosfato (2MeSAMP) e combinações de dois ou mais dos mesmos.

15. Kit **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende pelo menos um dispositivo para coleta e estabilização de sangue ou de uma composição compreendendo um componente de sangue, em que o dispositivo tem uma primeira extremidade e uma segunda extremidade e pelo menos uma parede interior definindo uma porção de reservatório para o recebimento do sangue ou da composição, em que o reservatório contém um agente de estabilização de sangue compreendendo variegina tendo a sequência de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 1, um fragmento do mesmo, em que o fragmento é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2-5 e análogos de tais fragmentos, os fragmentos análogos são selecionados do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 6-16, isoladamente ou em combinação com um dissacarídeo polissulfatado, preferivelmente octassulfato de sacarose, ou uma combinação dos mesmos, cada um em uma quantidade eficaz para estabilizar as plaquetas no sangue ou no

componente de sangue do mesmo, em que o variegin ou o fragmento do mesmo pode estar presente no dispositivo em uma concentração de 1 μM a 1 mM, e em que o dissacarídeo polissulfatado pode estar presente no dispositivo em uma concentração de 50 μM a 50 mM, e em que o kit opcionalmente compreende um segundo dispositivo compreendendo ainda um antagonista de plaquetas.

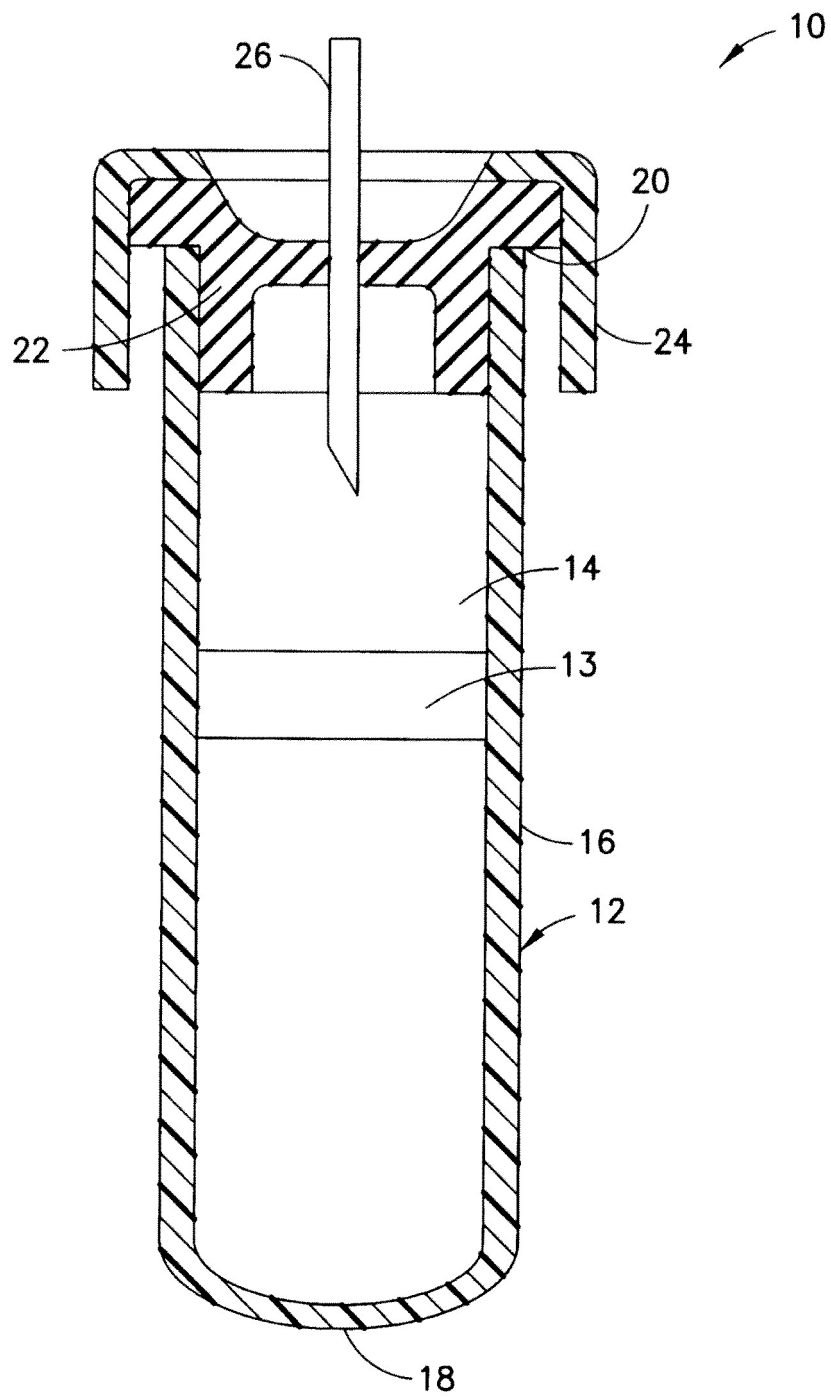


FIG. 1

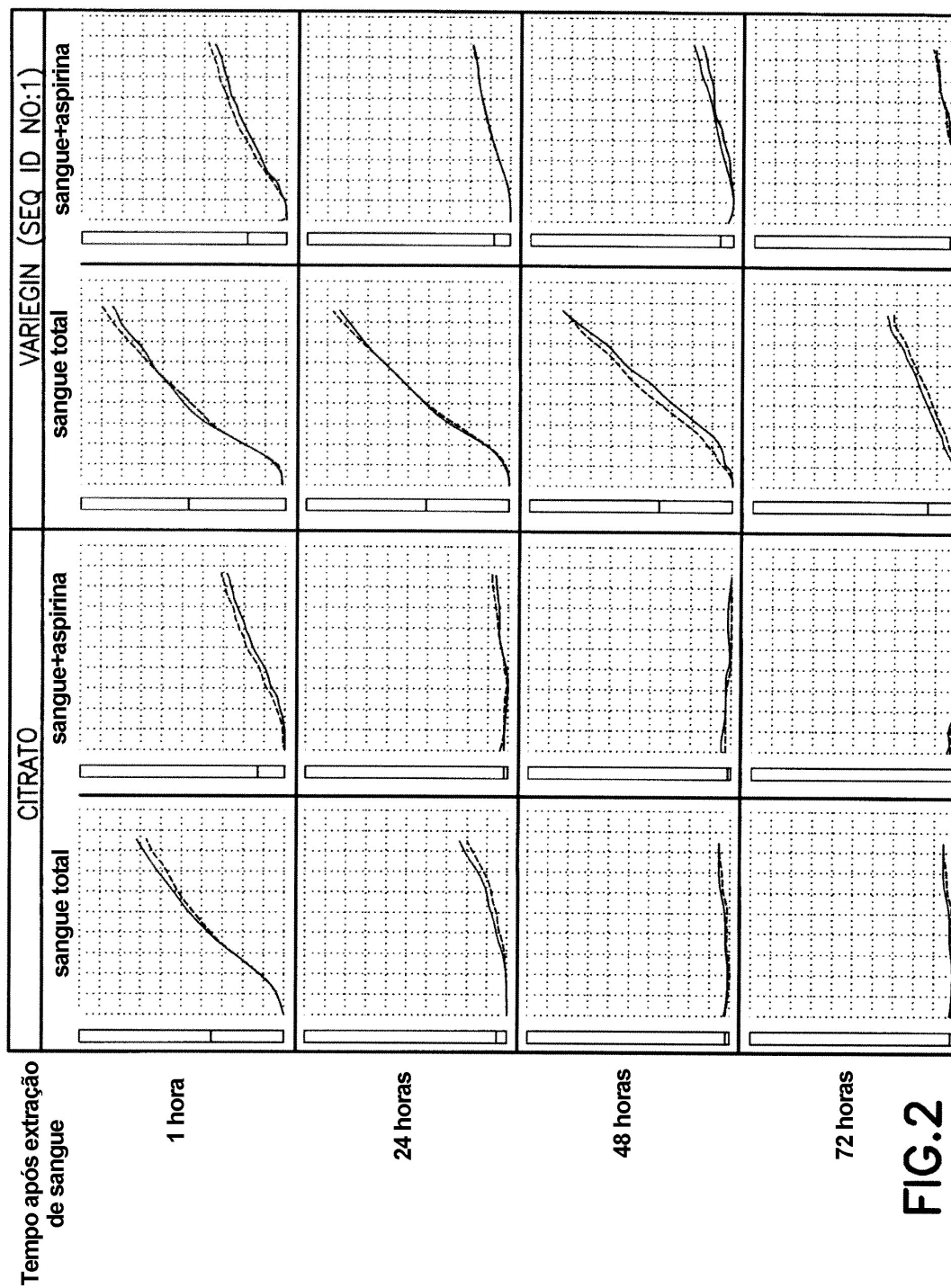
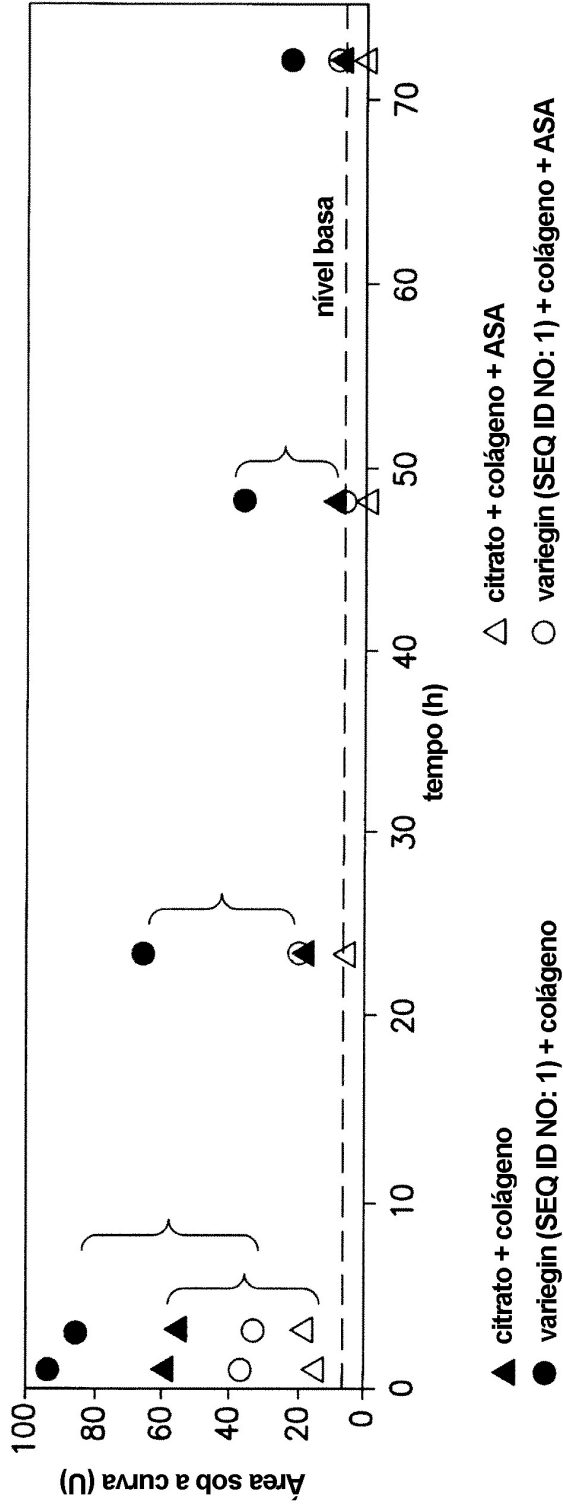


FIG.2



Sujeito 1 data de agregação

FIG.3

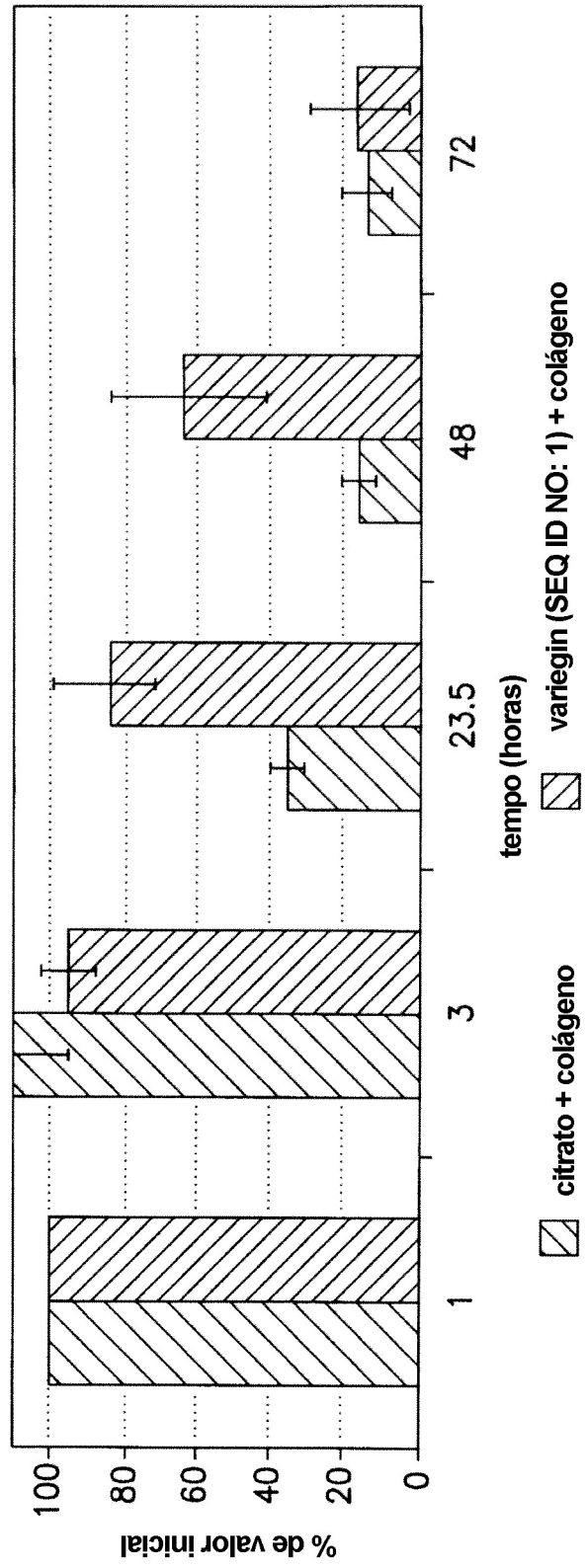


FIG.4