



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 112**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06700777 .3**

96 Fecha de presentación : **09.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1833982**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

54 Título: **Ensayo de hemostasia.**

30 Prioridad: **07.01.2005 EP 05075030**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.04.2011**

73 Titular/es: **Stichting Katholieke Universiteit  
Geert Groteplein-Noord 9  
6525 EZ Nijmegen, NL**

72 Inventor/es: **Van Heerde, Waander, Laurens**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 112 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

# ES 2 357 112 T3

## DESCRIPCIÓN

Ensayo de hemostasia.

5 La presente invención se refiere a un ensayo de hemostasia para determinar simultáneamente dos o más parámetros de reacción, en particular la generación de trombina y la generación de plasmina. La invención proporciona además un kit para realizar el ensayo.

10 En condiciones fisiológicas normales, la hemostasia, la disponibilidad de la sangre para coagularse e impedir la pérdida de sangre, se mantiene en un balance hemostático mediante mecanismos de acción y reacción. El balance hemostático es dependiente de la vía pro- y anticoagulante, como el sistema fibrinolítico y las paredes de los vasos. En el caso en el que el balance hemostático esté fuera de equilibrio, la coagulación patológica (bloqueo de los vasos) o el sangrado (hemorragia) pueden suplantar la hemostasia normal.

15 Las anomalías del sistema hemostático pueden ser congénitas o adquiridas. En estos casos es clínicamente esencial diagnosticar, hacer el seguimiento y controlar al paciente con el fin de optimizar la intervención terapéutica.

20 La mayoría de las pruebas de coagulación implican ensayos de punto final, que detectan el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo o el tiempo real de la lisis del trombo por medio de turbidimetría. Aunque realizados de forma rutinaria, los ensayos de coagulación actualmente disponibles tienen limitaciones inherentes que los hacen potencialmente poco fiables como herramientas para llevar a cabo el seguimiento adecuado de la coagulación. Además, no siempre hay una buena correlación entre los resultados de las pruebas de coagulación y la prevención de una hemorragia posoperatoria o de una trombosis recurrente. La mayoría de las limitaciones están relacionadas con el hecho de que son pruebas de punto final que miden el tiempo de formación de coágulos *in vitro* y requieren la adición de reactivos exógenos (tal como el factor tisular, caolín o iones  $Ca^{++}$  para reaprovisionar los fijados por un anticoagulante), y por eso, no necesariamente reflejan el potencial trombótico del paciente (potencial de coagulación).

30 Comparadas con las pruebas descritas anteriormente, el documento EP-420332 describe un ensayo mejorado de generación de trombina. En este ensayo, no sólo se recopila información sobre la coagulación del plasma sino también sobre la generación total de trombina después de la formación del coágulo. Estos ensayos se realizaron en primer lugar con sustratos cromogénicos y más adelante con sustratos fluorogénicos. Además, se describen varios ensayos de generación de trombina con plasma pobre en plaquetas y rico en plaquetas.

35 En estos ensayos, de nuevo, la limitación es la medida de una incrementada capacidad de coagulación (trombofilia). La trombofilia es un término usado para describir un grupo de condiciones en las que hay una tendencia incrementada, con frecuencia repetida y con frecuencia durante un largo periodo de tiempo, a la coagulación excesiva. La solicitud de patente internacional WO 03/093831 A describe un método para determinar, en tiempo real, el curso de la actividad de la trombina pero no permite determinar simultáneamente la actividad de la trombina y la actividad de la plasmina.

40 Existe, por lo tanto, la necesidad de un nuevo ensayo que no tenga los inconvenientes anteriormente indicados, que sea más simple, y pueda medir la fibrinólisis con dependencia de la generación de trombina. El objeto de la invención es proporcionar este ensayo.

45 En la investigación que condujo a la invención, se desarrolló un nuevo ensayo, en concreto un ensayo fluorimétrico, en el que se puede determinar, simultáneamente en el tiempo, la generación de trombina en un único pocillo. El ensayo de hemostasia de la invención difiere de los ensayos existentes en dos formas. El ensayo de la invención proporciona simultáneamente la detección de la generación de trombina y de plasmina en un único pocillo. Además, el ensayo usa la generación de trombina dependiente de la generación de plasmina, en vez de la adición de trombina o de fibrina. Esto conduce a la posibilidad de medir anomalías en la coagulación inducidas por aberraciones en la fibrinólisis.

55 La invención se refiere, por eso, a un ensayo de hemostasia que comprende el suministro de una mezcla de reacción que comprende un producto sanguíneo que va a ser comprobado, una molécula activadora para inducir la generación de trombina, un sustrato específico de la trombina que tras la ruptura por acción de la trombina produce una señal medible específica de la trombina, una molécula activadora para inducir la generación de plasmina, un sustrato específico de la plasmina que tras la ruptura por acción de la plasmina produce una señal medible específica de la plasmina, iones calcio y una superficie que contiene fosfolípidos, y determinar la cantidad de trombina y la cantidad de plasmina generada en la mezcla de reacción en el tiempo, partiendo de  $t = 0$ , midiendo las señales específicas de la trombina y de la plasmina.

60 El ensayo de la invención se puede realizar adecuadamente en un único recipiente. Para ensayos, en gran cantidad, de muestras de sangre, el recipiente en el que el ensayo se realiza adecuadamente es un pocillo de una placa de microvaloración. Estas placas de microvaloración se pueden tratar automáticamente en un equipo que es bien conocido en la técnica. En una realización, los reactivos están adecuadamente contenidos en el recipiente antes de que se añada la muestra de sangre y pueden, por ejemplo, aplicarse a la pared o estar presente en forma liofilizada. Esto es particularmente útil en los kits. Sin embargo, la otra forma también es posible, es decir añadir primero el producto sanguíneo al pocillo y luego los otros reactivos.

## ES 2 357 112 T3

El ensayo de la invención se puede usar para determinar la generación de trombina y de plasmina en diversos productos sanguíneos, tales como plasma, sangre entera, líquido de drenaje y plasma rico en plaquetas.

5 La superficie que contiene fosfolípidos consiste, por ejemplo, en vesículas de fosfolípidos, cefalina, células, en particular células endoteliales, plaquetas sanguíneas, bacterias, virus, matrices de células endoteliales o microvasos, u otras superficies conocidas por las personas expertas en la materia.

10 La molécula activadora para inducir la generación de trombina es adecuadamente el factor tisular (TF). El TF actúa de mediador en la hemostasia formando complejos con el factor VIIa para convertir directamente X en Xa (vía extrínseca), o indirectamente generando Xa mediante la conversión de IX en IXa, que, a su vez, forma complejo con VIIIa para convertir X en Xa. El factor Xa, una vez generado, forma complejo con su co-factor, Va, para convertir la protrombina (II) en trombina (IIa). Se prefiere el TF porque es el mismo activador que se encuentra en el cuerpo para la vía extrínseca. Los activadores para la vía intrínseca son, por ejemplo, el vidrio, el caolín, la sílice, o un ácido.

15 La plasmina se forma por la activación de la pro-enzima, plasminógeno, mediante activadores del plasminógeno. Los activadores tisulares del plasminógeno se encuentran en muchos tejidos. El activador tisular del plasminógeno es liberado por las células endoteliales y las plaquetas activadas. La molécula activadora para inducir la generación de plasmina en el ensayo de la invención es, adecuadamente, el activador tisular del plasminógeno (tPA) porque también es el activador en la situación natural en el cuerpo. Ejemplos de otros activadores son la uroquinasa y la estreptoquinasa.

20 El ensayo de hemostasia de la invención usa, preferiblemente, dos sustratos fluorescentes, uno para la trombina y uno para la plasmina, con diferente excitación fluorescente y espectros de emisión. Después de la ruptura por acción de la trombina del sustrato fluorescente específico de la trombina, se puede determinar la señal fluorescente, después de la excitación, en la longitud de onda de la emisión. Esto mismo es válido para el sustrato fluorescente específico de la plasmina.

30 Preferiblemente, se eligen dos sustratos fluorescentes, que no interfieran el uno con el otro. En la práctica esto significa que los espectros de los diferentes sustratos fluorescentes no se solapan. El ensayo de la invención se puede por eso llevar a cabo para medir simultáneamente tanto la generación de trombina como la de plasmina. Ambos productos se pueden determinar en tiempo real en un único pocillo usando un fluorímetro equipado con dos conjuntos de filtros. Son ejemplos de sustratos adecuados los siguientes: sustrato específico de la trombina unido a 7-amino-4-metilcumarina (AMC) (Bz- $\beta$ -Ala-Gly-Arg-AMC-AcOH), y sustrato específico de la plasmina unido a rodamina 110 (bis-(amida de la CBZ-L-fenilalanil-L-arginina)).

35 El ensayo de la invención se puede usar para determinar los efectos de fármacos, proteínas, células u otros aditivos tanto sobre la generación de trombina como la de plasmina, y también el efecto de una generación alterada de trombina o de plasmina sobre la generación de plasmina o la de trombina, respectivamente. Con el fin de medir el efecto de estos aditivos, se pueden añadir a la mezcla de reacción. Estos aditivos también se pueden aplicar a los pocillos del recipiente en el que se va a llevar a cabo el ensayo, como por ejemplo los pocillos de placas de 96 pocillos. Cuando las células endoteliales son parte de la mezcla de reacción, se pueden cultivar en los pocillos.

Además, se pueden elegir diferentes condiciones para comenzar la reacción. Por ejemplo, se pueden usar diferentes concentraciones de reactivos.

45 El método de la invención tiene las siguientes ventajas comparado con las pruebas disponibles en la actualidad. Se obtiene, en un ensayo, información sobre la vía extrínseca de coagulación así como sobre la intrínseca. Hasta la fecha, esta información se puede recoger únicamente realizando los ensayos estándar de coagulación APTT, así como el PT. La invención proporciona además la posibilidad de determinar también la hipercoagulabilidad, que no es posible con el ensayo estándar de generación de trombina realizado en un plasma pobre en plaquetas. Con el ensayo de la invención es posible el análisis sencillo de la generación de trombina sin la desfibrinación del plasma. Esta etapa condicional previa se requiere inicialmente en el conocido ensayo de Hemker de generación de trombina. Además, el ensayo de la invención proporciona el análisis, directo y en línea, tanto de la generación de trombina como de plasmina, lo que permite la interpretación directa de los resultados. Además, se obtienen resultados inmediatos sobre la fibrinólisis y el efecto de la fibrinólisis sobre la coagulación. No se tienen que realizar etapas condicionales previas para analizar la fibrinólisis. Estas etapas son un requisito previo en la prueba de la lisis de coágulos de euglobulina.

60 Además del ensayo específico de hemostasia anteriormente descrito, la solicitud describe un ensayo más general de hemostasia en el que se analizan simultáneamente dos o más reacciones. El requisito principal es que no se solapen los espectros de los diferentes sustratos que se tratan en la reacción que van a ser comprobados.

65 Este método general comprende el suministro de una mezcla de reacción que comprende una superficie, una muestra que va a ser comprobada, moléculas activadores para inducir las reacciones que se van a medir, sustratos que producen una señal medible que es el resultado de la reacción, y la determinación de las señales generadas en la mezcla de reacción en el tiempo partiendo de  $t = 0$ . La superficie es, concretamente, una superficie fosfolipídica para la generación de trombina e intrínsecamente de la fibrina formada para la generación de plasmina.

En la realización específica de la invención, las reacciones que van a ser comprobadas son la generación de trombina y la generación de plasmina. También se pueden comprobar otros pares de reacciones, con diferentes pares de

## ES 2 357 112 T3

factores de coagulación y/o de células. Un ejemplo es la generación de trombina y liberación de enzimas específicas de las plaquetas. El sustrato depende de la enzima que va a ser comprobadas. En general, el sistema puede aceptar incluso más de dos análisis en un experimento siempre que los espectros no se solapen.

5 La invención se refiere además a un kit para realizar el ensayo de la invención, que comprende un recipiente que comprende uno o más de los siguientes reactivos: una molécula activadora para inducir la generación de trombina, un sustrato específico de la trombina que tras la ruptura por acción de la trombina produce una señal medible específica de la trombina, un sustrato específico de la plasmina que tras la ruptura por acción de la plasmina produce una señal medible específica de la plasmina, una molécula activadora para inducir la generación de plasmina, una superficie fosfolipídica y iones calcio. Los otros reactivos de esta lista que no están presentes en el recipiente o bien son parte del kit o se pueden añadir por separado. Es importante tener todos los reactivos presentes al realizar el ensayo. La reacción se pone en marcha cuando todos los reactivos y el producto sanguíneo que se va a comprobar están presentes en la mezcla de reacción.

15 Las diferentes realizaciones de los diversos reactivos se han descrito anteriormente.

En los ejemplos que siguen, el ensayo de la invención ha sido comprobado usando muestras de pacientes diferentes. Se establecieron variaciones tanto intra-ensayos como inter-ensayos.

20 Se hace referencia a las siguientes figuras:

La Figura 1 muestra una típica representación gráfica resultante del ensayo de la invención. La línea (a) representa la primera derivada de la generación de trombina expresada en nM/minuto (mediante una curva de cálculo estándar). La línea (b) representa la primera derivada de la generación de plasmina expresada en FU/minuto (unidades fluorogénicas/minuto). Los siguientes datos se pueden generar fuera del gráfico:

- 1: Tiempo de latencia de la generación de trombina.
- 2: Tiempo del pico de trombina.
- 30 3: Generación máxima de trombina.
- 4: Potencial de la trombina.
- 35 5: Potencial procoagulante de la trombina.
- 6: Potencial anticoagulante de la trombina.
- 7: Tiempo de caída de la generación de plasmina (comienza la formación del trombo).
- 40 8: Tiempo del pico de generación de plasmina (trombo solubilizado).
- 9: Tiempo de lisis del trombo.
- 45 10: Nivel de generación de plasmina en el tiempo del pico de la generación de plasmina.
- 11: Fase de aceleración del potencial de plasmina (área de la lisis del trombo).
- 50 12: Potencial de plasmina (medido durante 10 minutos).

La Figura 2 muestra la generación de trombina (A) y de plasmina (B) en presencia de diferentes concentraciones de hirudina, usando plasma citrado normal mezclado (CTAD NP).

55 La Figura 3 muestra el efecto de la valoración del tPA sobre la generación de trombina (A) y de plasmina (B) usando plasma citrado normal mezclado.

La Figura 4 muestra la generación de trombina (A) y de plasmina (B) después de la adición de proteína C activa usando plasma citrado normal mezclado.

60 La Figura 5 muestra la generación de trombina (A) y de plasmina (B) en presencia de diferentes concentraciones de trombomodulina (TM) usando plasma citrado normal mezclado.

65 La Figura 6 muestra la generación de trombina (A) y de plasmina (B) en presencia de trombomodulina (TM) y del inhibidor de la carboxipeptidasa (CPI), el inhibidor de TAFI usando plasma citrado normal mezclado.

## ES 2 357 112 T3

La Figura 7 muestra la generación de trombina (A) y de plasmina (B) en presencia de diferentes concentraciones de plasmina usando plasma citrado normal mezclado.

La Figura 8 muestra la generación de trombina y de plasmina en plasma citrado normal mezclado de un paciente con deficiencia de alfa-2-anti-plasmina y de un paciente con exceso de PAI-1.

La Figura 9 muestra la generación de trombina y de plasmina en plasma de un paciente con deficiencia de factor VII, antes y después de la suplección del factor VIIa.

En la Figura 10, las líneas a y d representan la generación de trombina (línea a) y de plasmina (líneas d) medidas usando un plasma citrado normal mezclado. Las líneas b y e representan el plasma de un paciente con hemofilia A grave, antes de la suplección del factor VIII, mientras que las líneas c y f representan el plasma de un paciente con hemofilia A después de la suplección del factor VIII.

La Figura 11 muestra la generación de trombina (línea a) y de plasmina (línea c) en plasma normal mezclado (NP) y en plasma de un paciente con deficiencia de protrombina (5), líneas b y d, respectivamente.

La Figura 12 muestra la generación de trombina (líneas a-e) y de plasmina (líneas f-j) en plasma normal mezclado (líneas a y f), y en plasma procedente de un paciente heterocigótico para el factor V Leiden (líneas b y g), heterocigótico para la mutación de la protrombina (líneas c y h), deficiencia de proteína S (líneas d e i), y deficiencia de proteína C (líneas e y j).

### Ejemplos

#### *Materiales y métodos*

##### *1. Sustratos*

Los sustratos usados para la realización de las pruebas fueron el sustrato específico de la trombina unido a 7-amino-4-metilcumarina (AMC) (Pentapharm, Bz- $\beta$ -Ala-Gly-Arg-AMC-AcOH, número de producto PF 082-21), y el sustrato específico de la plasmina unido a rodamina 110 (Molecular Probes, rodamina 110, dihidrocloruro de bis-(amida de la CBZ-L-fenilalanil-L-arginina), número de producto R-6520).

##### *2. Condiciones del ensayo*

Las condiciones del ensayo fueron:

80  $\mu$ l plasma citrado

2  $\mu$ l cefalina (Roche, número de producto 524298 (disuelta en 1 ml de agua destilada))

2  $\mu$ l factor tisular recombinante (Innovin, Dade Behring) (concentración final, 0,1 pM)

19  $\mu$ l solución salina tamponada con Tris (TBS, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) que contiene

- sustrato fluorogénico específico de la trombina (concentración final, 833  $\mu$ M)

- sustrato fluorogénico específico de la trombina (concentración final, 33  $\mu$ M)

17  $\mu$ l TBS que contiene

- tPA recombinante (Actilyse, Boehringer Ingelheim) (concentración final, 150 IU/ml)

-  $\text{CaCl}_2$  (concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$ , 16,7 mM)

##### *3. Método*

Se determinaron las señales fluorogénicas en un fluorímetro termostatzado. Para la trombina (línea a), la longitud de onda de excitación era de 355 nm, y la longitud de onda de emisión era de 460 nm. Para la plasmina (línea b), la longitud de onda de excitación era de 485 nm, y la longitud de onda de emisión era de 520 nm. Se calcularon las primeras derivadas y se representaron gráficamente. Una representación gráfica típica se muestra en la Figura 1.

## 4. Experimentos

En el Ejemplo 1, se realizó el experimento anteriormente descrito con variaciones en la concentración de los diversos reactivos. En el Ejemplo 2, se comprobó el plasma de diversos pacientes.

## Ejemplo 1

## Efecto de los diferentes reactivos

## 1. Hirudina

Se comprobó la generación de trombina y de plasmina en presencia de diferentes concentraciones de hirudina. Los resultados se muestran en la Figura 2 y en la Tabla 1.

TABLA 1

Hirudina	0 IU/ml	2 IU/ml	8 IU/ml	17 IU/ml	33 IU/ml	83 IU/ml
Tiempo de latencia de generación de trombina	5,0	6,0	9,5	12,0	26,0	N.D.
Tiempo hasta pico de trombina	8,5	14,0	19,0	22,5	31,5	N.D.
Altura del pico de trombina	273	220	187	130	89	N.D.
Potencial de trombina (ETP)	2391	2233	1978	1425	933	N.D.
ETP, procoagulante	488	480	510	364	229	N.D.
ETP, anticoagulante	1903	1753	1469	1061	704	N.D.
Tiempo de caída de plasmina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Tiempo del pico de plasmina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Tiempo de lisis de la fibrina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Altura de pico de la plasmina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Altura pico de plasmina- Altura caída plasmina)/FLT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Potencial de plasmina, fase aceleración	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Potencial plasmina, PPT+10min	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

En la Figura 2, la generación de trombina se presenta en el panel A, mientras que la generación de plasmina se muestra en el panel B. Se usaron diferentes concentraciones de hirudina: 0 (línea a), 2 (línea b), 8 (línea c), 17 (línea d), 33 (línea e) y 83 (línea f) U/ml.

La hirudina es un inhibidor directo de la trombina. El aumento de la concentración de hirudina inhibe y retarda la generación de trombina, probablemente debido al hecho de que tanto el factor V, el factor VIII y el factor XI no son activados por la trombina. En el panel B se muestra que debido a la inhibición de la generación de la trombina, únicamente se retarda la generación de la plasmina ya que se retarda la formación de la fibrina.

## 2. Inhibidor de la tripsina

También se comprobó la adición de inhibidor de tripsina (CTI), el inhibidor de la vía intrínseca. El CTI no afecta ni a la generación de trombina ni a la generación de plasmina lo que indica que la reacción es completamente dependiente del factor tisular (no se muestran los datos).

## ES 2 357 112 T3

### 3. tPA

Para una valoración del tPA en plasma normal mezclado, se usaron diferentes concentraciones de activador de plasminógeno tisular (t-PA) como sigue: 600 (línea a), 230 (línea b), 150 (línea c), 110 (línea d), 75 (línea e) y 0 (línea f) IU/ml. Los resultados se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 2. El panel A de la Figura 3 representa la generación de trombina. El panel B representa la generación de plasmina.

TABLA 2

Valoración del t-PA	600 IU/ml	230 IU/ml	150 IU/ml	110 IU/ml	75 IU/ml	0 IU/ml
Tiempo de latencia de generación de trombina	5,0	5,5	5,5	5,5	6,0	6,0
Tiempo hasta pico de trombina	10,0	12,0	14,0	13,0	11,5	13,5
Altura del pico de trombina	257	196	151	160	195	111
Potencial de trombina (ETP)	2095	2136	2024	1944	1945	1472
ETP, procoagulante	482	452	464	434	379	306
ETP, anticoagulante	1613	1684	1560	1510	1566	1166
Tiempo de caída de plasmina	5,0	5,5	7,0	5,5	6,0	N.D.
Tiempo del pico de plasmina	13,0	18,0	24,0	38,5	45,0	N.D.
Tiempo de lisis de la fibrina	8,0	12,5	17,0	33,0	39,0	N.D.
Altura de pico de la plasmina	1418	901	716	703	74	N.D.
Altura pico de plasmina-Altura caída plasmina)/FLT	169,7	71,0	43,0	21,4	1,4	N.D.
Potencial de plasmina, fase aceleración	4211	3808	4096	8052	1345	N.D.
Potencial plasmina, PPT+10min	12982	7721	6586	7469	391	N.D.

Cuanto más alta es la concentración de t-PA se genera más plasmina y, curiosamente, más trombina. Bajo condiciones normales, se usan en el ensayo 150 IU/ml de t-PA (d). El uso de esta concentración permite la detección la actividad del inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI). Si la concentración de t-PA es más alta, la lisis del coágulo es más rápida y se puede observar menos actividad del TAFI.

### 4. Proteína C activa

Para comprobar la generación de trombina (A) y de plasmina (B), después de la adición de proteína C activa (APC), se usaron diferentes concentraciones de APC como sigue: 10,25 microgramos/ml (línea a), 5,1 (línea b), 4,1 (línea c), 2,6 (línea d), 1,7 (línea e), y 0 (línea f) microgramos/ml. Los resultados se muestran en la Figura 4 y en la Tabla 3.

## ES 2 357 112 T3

TABLA 3

5		10,25 µg/ml	5,1 µg/ml	4,1 µg/ml	2,6 µg/ml	1,7 µg/ml	0 µg/ml
10	APC						
15	Tiempo de latencia de generación de trombina	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
	Tiempo hasta pico de trombina	6,5	6,0	5,5	5,5	5,5	5,5
	Altura del pico de trombina	69	97	140	166	222	229
	Potencial de trombina (ETP)	982	1176	1487	1682	1974	2109
20	ETP, procoagulante	138	163	202	233	345	326
	ETP, anticoagulante	844	1014	1285	1449	1630	1783
	Tiempo de caída de plasmina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tiempo del pico de plasmina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
25	Tiempo de lisis de la fibrina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Altura de pico de la plasmina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Altura pico de plasmina-Altura caída plasmina)/FLT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
30	Potencial de plasmina, fase aceleración	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
35	Potencial plasmina, PPT+10min	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

En la Figura 4, la línea (f) representa la situación sin adición de APC. La proteína C activa desactiva el factor Va y el factor VIIIa. Como tal, la APC es parte de la vía anticoagulante. Como se esperaba, la adición de solamente APC afecta al potencial de trombina (panel A) y afecta a la actividad del TAFI, ya que el TAFI necesita concentraciones relativamente grandes de trombina para activarse. En la situación sin APC (línea f) la fibrinólisis se retarda debido a la actividad del TAFI.

### 5. Trombomodulina

Se midió la generación de trombina y de plasmina en presencia de diferentes concentraciones de trombomodulina (TM).

La generación de trombina se presenta en el panel A de la Figura 5 y en la Tabla 4, mientras que la generación de plasmina se muestra en el panel B. Se usaron diferentes concentraciones de TM como sigue: 0 (línea a), 0,085 nM (línea b), 0,17 (línea c), 0,34 (línea d), 10,2 (línea e), 51 (línea f) y 102 nM (línea g).

La TM tiene dos actividades que están basadas en la unión con la trombina. En primer lugar, la TM activa la proteína C a proteína C activa (APC). La APC desactiva el factor Va y el factor VIIIa y, por eso, inhibe la formación de trombina (A). La segunda actividad es la activación del inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina (TAFI). El TAFI inhibe la fibrinólisis suprimiendo de la fibrina los aminoácidos carboxi terminales y suprime, por ello, los sitios de unión del plasminógeno. Cuanto más TM hay más tarda en comenzar la generación de plasmina, lo que se espera que va a ser una actividad del TAFI (panel B). La activación del TAFI tiene lugar a concentraciones de TM más bajas que la activación de la APC.

65

## ES 2 357 112 T3

TABLA 4

	0 nM TM	0,085 nM	0,17 nM	0,34 nM	10,2 nM	51 nM	102 nM
5							
10	Trombomodulina (TM)						
	Tiempo de latencia de generación de trombina						
	5,0	4,5	6,0	5,5	4,5	N.D.	N.D.
	Tiempo hasta pico de trombina						
	12,5	12,0	13,0	13,0	12,5	N.D.	N.D.
15	Altura del pico de trombina						
	98	104	74	66	23	N.D.	N.D.
	Potencial de trombina (ETP)						
	1419	1392	1023	916	318	N.D.	N.D.
	ETP, procoagulante						
	267	299	189	196	60	N.D.	N.D.
20	ETP, anticoagulante						
	1152	1093	834	720	258	N.D.	N.D.
	Tiempo de caída de plasmina						
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tiempo del pico de plasmina						
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Tiempo de lisis de la fibrina						
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
25	Altura de pico de la plasmina						
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Altura pico de plasmina- Altura caída plasmina)/FLT						
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
30	Potencial de plasmina, fase aceleración						
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Potencial plasmina, PPT+10min						
	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

35

### 6. Inhibidor de la carboxipeptidasa

35 Se midió la generación de trombina y la generación de plasmina en presencia de trombomodulina (TM) y del  
40 inhibidor de la carboxipeptidasa (CPI), el inhibidor del TAFI. La línea (a) representa la situación normal sin ninguna  
adición. La línea (b) representa la situación en presencia de 0,68 nM de TM. La línea (d) representa la situación con  
33 microgramos/ml de CPI y la línea (c) la situación con TM y CPI. La Figura 6 y la Tabla 5 muestran los resultados.

45 De nuevo, la TM activa el TAFI dando como resultado una generación retardada de plasmina. En presencia de CPI,  
la generación de plasmina comienza inmediatamente. El CPI suprime también el efecto de la TM, lo que indica que  
efectivamente la TM activa el TAFI. Por eso, incluso en una situación normal hay actividad del TAFI.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

TABLA 5

	CTAD normal mezclado	0,68 nM TM	0,68 nM TM + 33 µg/ml CP	33 µg/ml normal mezclado
Figura 6				
Tiempo de latencia de generación de trombina	5,0	5,5	5,0	4,5
Tiempo hasta pico de trombina	12,5	10,5	12,0	11,5
Altura del pico de trombina	98	106	76	87
Potencial de trombina (ETP)	1419	1260	1029	1369
ETP, procoagulante	267	228	205	227
ETP, anticoagulante	1152	1032	825	1143
Tiempo de caída de plasmina	9,0	N.D.	5,0	7,5
Tiempo del pico de plasmina	37,5	N.D.	29,5	26,5
Tiempo de lisis de la fibrina	28,5	N.D.	24,5	19,0
Altura de pico de la plasmina	545	N.D.	457	459
Altura pico de plasmina-Altura caída plasmina)/FLT	19,7	N.D.	19,6	26,5
Potencial de plasmina, fase aceleración	5434	N.D.	4210	3960
Potencial plasmina, PPT+10min	5842	N.D.	4750	4749

### 7. Plasmina

Se midió la generación de trombina y de plasmina en presencia de diferentes concentraciones de plasmina. La generación de trombina se presenta en el panel A de la Figura 7, mientras que la generación de plasmina se muestra en el panel B (véase también la Tabla 6). Se usaron las siguientes concentraciones finales de plasmina: 0 (línea a), 1 (línea b), 3 (línea c), 6 (línea d), 9 (línea e), 13 (línea f), 16 (línea g), 19 (línea h), 22 (línea i), y 25 (línea j) microgramos/ml.

Para probar que la plasmina afecta a la generación de trombina, se añadió directamente plasmina a la mezcla de reacción. Como se esperaba, la adición de plasmina directamente tuvo un efecto sobre la curva de generación de plasmina. Además, la plasmina afecta también a la generación de trombina ya que acorta el tiempo de latencia de la generación de trombina y aumenta la altura máxima del pico de trombina.

Tabla 6

	65	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5	
					25 µg/ml plasmina	22 µg/ml plasmina	19 µg/ml plasmina	16 µg/ml plasmina	13 µg/ml plasmina	9 µg/ml plasmina	6 µg/ml plasmina	3 µg/ml plasmina	1 µg/ml plasmina	Sin plasmina
Series 1-10														
Tiempo de latencia de generación de trombina					3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	4,0	5,0	5,0	5,0
Tiempo hasta pico de trombina					6,5	7,5	8,0	8,0	8,0	8,5	8,0	10,0	11,0	11,5
Altura del pico de trombina					208	178	159	160	158	136	172	130	118	114
Potencial de trombina (ETP)					1855	1739	1717	1927	2063	1960	2051	1839	1741	1729
ETP, procoagulante					403	439	418	428	398	307	340	324	290	296
ETP, anticoagulante					1452	1300	1299	1499	1666	1654	1711	1515	1451	1433
Tiempo de caída de plasmina					N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Tiempo del pico de plasmina					N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Tiempo de lisis de la fibrina					N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Altura de pico de la plasmina					N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Altura pico de plasmina- Altura caída plasmina)/FLT					N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Potencial de plasmina, fase aceleración					N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Potencial plasmina, PPT+10min					N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Ejemplo 2

Ensayo de diversas condiciones clínicas

5 1. Pacientes con fibrinólisis

La Figura 8 muestra la generación de trombina (líneas a-c) y de plasmina (líneas d-f) en plasma mezclado normal (líneas c, f), plasma de un paciente con deficiencia de alfa-2-anti-plasmina (líneas b, e), y un paciente con exceso de PAI-1 (líneas a, d), véase también la Tabla 7).

10 TABLA 7

	PAI-1 en exceso	Deficiencia de $\alpha$ -2-anti	Plasma mezclado normal
>200, series 1-3			
Tiempo de latencia de generación de trombina	6,0	3,5	4,5
Tiempo hasta pico de trombina	13,0	5,0	10,0
Altura del pico de trombina	121	277	115
Potencial de trombina (ETP)	1652	1786	1553
ETP, procoagulante	337	313	288
ETP, anticoagulante	1316	1437	1266
Tiempo de caída de plasmina	N.D.	N.D.	N.D.
Tiempo del pico de plasmina	N.D.	N.D.	N.D.
Tiempo de lisis de la fibrina	N.D.	N.D.	N.D.
Altura de pico de la plasmina	N.D.	N.D.	N.D.
Altura pico de plasmina-Altura caída plasmina)/FLT	N.D.	N.D.	N.D.
Potencial de plasmina, fase aceleración	N.D.	N.D.	N.D.
Potencial plasmina, PPT+10min	N.D.	N.D.	N.D.

55 En este ejemplo se observó que el paciente con alfa-2-AP (líneas b, e) tenía una altura de pico de plasmina muy incrementado debido a este tiempo de latencia disminuido en la generación de trombina, e incluso a la incrementada generación de trombina. El paciente con un exceso de inhibidor del activador de plasminógeno de tipo 2 (PAI-2) (líneas a, d) muestra un efecto opuesto. La generación de plasmina está casi ausente y la generación de trombina retardada. No se observa ningún efecto sobre la generación total de trombina.

60 2. Deficiencia del factor VII

65 Se midió la generación de trombina y de plasmina en plasma de un paciente con deficiencia de factor VII antes (líneas a, c) y después de la suplección del factor VII (líneas b, d). La línea a de la figura 9 representa la generación de trombina y la línea c la de plasmina antes de la suplección del factor VII(a), mientras que las líneas b y d son después de 10 minutos de la suplección del factor VIIa con 40 microgramos/kg, respectivamente. Véase también la Tabla 8.

# ES 2 357 112 T3

TABLA 8

	Series 1-2	Antes de la infusión del factor VIIa	Después de la infusión del factor VIIa
5			
10			
15			
20			
25			
30			
	Tiempo de latencia de generación de trombina	5,5	3,5
35	Tiempo hasta pico de trombina	11,5	4,5
	Altura del pico de trombina	263	269
	Potencial de trombina (ETP)	2547	2519
	ETP, procoagulante	506	238
40	ETP, anticoagulante	2041	2281
	Tiempo de caída de plasmina	9,0	3,5
	Tiempo del pico de plasmina	32,0	29,0
	Tiempo de lisis de la fibrina	23,0	25,5
45	Altura de pico de la plasmina	1081	1458
	Altura pico de plasmina-Altura caída plasmina)/FLT	49,3	58,8
50	Potencial de plasmina, fase aceleración	9039	12989
	Potencial plasmina, PPT+10min	13257	18139

55

60 El paciente tiene <1% de actividad del factor VII y muestra una curva de generación de trombina retardada y una curva de generación de plasmina retardada (líneas a y c). La suplección del factor VIIa disminuye el tiempo de latencia de la generación de trombina y de plasmina (líneas b y d). Curiosamente, no se observa ningún efecto en la generación total de trombina (potencias de trombina) indicando que no se ve afectado el bucle de Bouma (que es el caso de pacientes con hemofilia A grave (HA)).

65 Al igual que en la generación de trombina, después de la activación, la generación de plasmina se retarda igual de rápido. Esto se puede explicar por el hecho de que la generación de plasmina se desencadena después de la formación de la fibrina. Igualmente se activa el inhibidor de la fibrinólisis TAFI.

3. Hemofilia A

En el ensayo de la invención, se comprobó el plasma de un paciente con hemofilia grave. La Figura 10 y la Tabla 9 muestran los resultados.

TABLA 9

	Plasma mezclado normal	Antes de la infusión de VIII	15 minutos después de la infusión de VIII
"28-12-2004, series 1-3			
Tiempo de latencia de generación de trombina	4,5	N.D.	4,5
Tiempo hasta pico de trombina	8,5	N.D.	9,5
Altura del pico de trombina	162	N.D.	111
Potencial de trombina (ETP)	1756	N.D.	1483
ETP, procoagulante	266	N.D.	199
ETP, anticoagulante	1490	N.D.	1284
Tiempo de caída de plasmina	6,0	N.D.	7,5
Tiempo del pico de plasmina	41,0	N.D.	28,0
Tiempo de lisis de la fibrina	35,0	N.D.	20,5
Altura de pico de la plasmina	543	N.D.	585
Altura pico de plasmina-Altura caída plasmina)/FLT	19,1	N.D.	32.2
Potencial de plasmina, fase aceleración	5743	N.D.	4232
Potencial plasmina, PPT+10min	5870	N.D.	7076

En la Figura 10, las líneas representan la generación de trombina (a-c) y de plasmina (d-f) medidas usando un plasma citrado normal mezclado. Las líneas b y e representan el plasma de un paciente con hemofilia A grave, antes de la suplección del factor VIII, mientras que las líneas c y f representan el plasma de un paciente con HA después de la suplección del factor VIII.

Se puede ver que la generación de trombina está claramente disminuida en el paciente con hemofilia A y parcialmente restituida por la suplección del factor VIII. A continuación, se potencia la generación de plasmina en el paciente antes de la suplección y se restituye parcialmente después de la suplección del factor VIII. La explicación puede ser que no está activado el TAFI, el inhibidor de la fibrinólisis, (debido al bajo nivel de trombina) y por eso se generará más plasmina.

4. Deficiencia de protrombina

El ensayo de la invención se usó para medir la generación de trombina (líneas a y b de la Figura 11) y de plasmina (líneas c y d) en plasma normal mezclado (a y c) y en plasma de un paciente con una protrombina insuficiente (5%) (b y d). Véase también la Tabla 10.

# ES 2 357 112 T3

TABLA 10

	CTAD normal mezclado	Protrombina deficiente
5		
10		
15		
	Nuevas, series 1-2	
20		
	Tiempo de latencia de generación de trombina	
	6,5	N.D.
	Tiempo hasta pico de trombina	
	16,0	N.D.
25	Altura del pico de trombina	
	137	N.D.
	Potencial de trombina (ETP)	
	1750	N.D.
	ETP, procoagulante	
	402	N.D.
	ETP, anticoagulante	
	1348	N.D.
30	Tiempo de caída de plasmina	
	13,0	N.D.
	Tiempo del pico de plasmina	
	42,0	N.D.
	Tiempo de lisis de la fibrina	
	29,0	N.D.
35	Altura de pico de la plasmina	
	567	N.D.
	Altura pico de plasmina-Altura caída plasmina)/FLT	
	18,9	N.D.
40	Potencial de plasmina, fase aceleración	
	5523	N.D.
	Potencial plasmina, PPT+10min	
	5884	N.D.

45 El paciente tiene una generación de trombina alterada y, como consecuencia, una aumentada actividad fibrinolítica que se puede explicar parcialmente por la falta de la activación del TAFI por la trombina. El TAFI, normalmente, inhibe la generación de plasmina.

50 *5. Pacientes con trombofilia*

55 Se midió la generación de trombina (líneas a a e) y de plasmina (líneas f a j) en plasma normal mezclado (líneas a y f), y en plasma procedente de diversos paciente con trombofilia, concretamente un paciente heterocigótico para el factor V Leiden (líneas b y g), heterocigótico para la mutación de la protrombina (líneas c y h), un paciente que tiene deficiencia de proteína S (líneas d e i) y un paciente que tiene deficiencia de proteína C (líneas e y j). Los resultados se muestran en la Figura 12 y en la Tabla 11.

60

65

# ES 2 357 112 T3

TABLA 11

	CTAD normal mezclado	F5 heterocigótico	F2 heterocigótico	PS	
5					
10					
15	Normal mezclado serie 16/12, Serie 1-5				
20	Tiempo de latencia de generación de trombina	4,5	4,05	4,0	3,5
	Tiempo hasta pico de trombina	11,5	7,5	7,5	6,5
	Altura del pico de trombina	141	246	343	209
25	Potencial de trombina (ETP)	1967	2354	2618	1924
	ETP, procoagulante	339	399	592	351
	ETP, anticoagulante	1628	1955	2026	1573
	Tiempo de caída de plasmina	9,0	4,0	4,0	3,5
30	Tiempo del pico de plasmina	29,5	34,5	38,5	33,5
	Tiempo de lisis de la fibrina	20,5	30,5	34,5	30,0
	Altura de pico de la plasmina	627	601	506	539
35	Altura pico de plasmina-Altura caída plasmina)/FLT	31,3	20,0	12,6	16,7
	Potencial de plasmina, fase aceleración	6151	5524	4612	4384
40	Potencial plasmina, PPT+10min	6923	6140	6333	5776

45 Curiosamente, todos los pacientes con trombofilia tienen un tiempo de latencia de generación de trombina disminuido, una generación de trombina total (potencial de trombina) aumentada y, curiosamente, una generación de plasmina disminuida, que da como resultado un tiempo de lisis del trombo aumentado. La explicación puede ser una mayor activación del TAFI y, debido a esto, una generación de plasmina retardada. Al cabo de un rato, la actividad del TAFI ha desaparecido y se produce la generación normal de plasmina.

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un ensayo de hemostasia que comprende el suministro de una mezcla de reacción que comprende un producto sanguíneo que va a ser comprobado, una molécula activadora para inducir la generación de trombina, un sustrato específico de la trombina que tras la ruptura por la acción de la trombina produce una señal medible específica de la trombina, una molécula activadora para inducir la generación de plasmina, un sustrato específico de la plasmina que tras la ruptura por acción de la plasmina produce una señal medible específica de la plasmina, una superficie que contiene fosfolípidos, y iones calcio, y la determinación de la cantidad de trombina y la cantidad de plasmina generada en la mezcla de reacción en el tiempo, partiendo de  $t = 0$ , midiendo las señales específicas de trombina y de plasmina.
2. Un ensayo según la reivindicación 1, en el que el producto sanguíneo que va a ser comprobado se selecciona de plasma, fluido de drenaje, sangre entera y plasma rico en plaquetas.
3. Un ensayo según la reivindicación 1 ó 2, en el que la molécula activadora para inducir la generación de trombina es un iniciador de la vía extrínseca, en particular el factor tisular (TF), o de la vía intrínseca, en particular vidrio, caolín, un ácido.
4. Un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la molécula activadora para inducir la generación de plasmina en el ensayo de la invención se selecciona de uroquinasa, estreptoquinasa y activador tisular del plasminógeno y es, preferiblemente, el activador tisular del plasminógeno (tPA).
5. Un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los sustratos son compuestos que en contacto con la molécula que se va a medir liberan un grupo medible.
6. Un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los sustratos son sustratos fluorescentes.
7. Un ensayo según la reivindicación 6, en el que los sustratos tienen diferentes espectros de excitación y de emisión.
8. Un ensayo según la reivindicación 7, en el que el sustrato específico de la trombina está unido a 7-amino-4-metilcumarina.
9. Un ensayo según la reivindicación 8, en el que el sustrato específico de la trombina es Bz- $\beta$ -Ala-Gly-Arg-AMC-AcOH.
10. Un ensayo según la reivindicación 7, en el que el sustrato específico de la plasmina está unido a rodamina 110.
11. Un ensayo según la reivindicación 10, en el que el sustrato específico es la (bis-(amida de la CBZ-L-fenilalanil-L-arginina)).
12. Un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la superficie que contiene fosfolípidos se selecciona de cefalina, células, en particular células endoteliales, plaquetas sanguíneas, bacterias, virus, matrices de células endoteliales o microvasos.
13. Un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para usarlo en la determinación de los efectos de fármacos, proteínas, células u otros aditivos tanto en la generación de trombina como en la de plasmina, que comprende la adición del fármaco, la proteína, la célula u otros aditivos a la mezcla de reacción.
14. Un kit para realizar el ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende un recipiente que comprende uno o más de los siguientes reactivos: una molécula activadora para inducir la generación de trombina, un sustrato específico de la trombina que tras la ruptura por la acción de la trombina produce una señal medible específica de la trombina, un sustrato específico de la plasmina que tras la ruptura por acción de la plasmina produce una señal medible específica de la plasmina, una molécula activadora para inducir la generación de plasmina, una superficie que contiene fosfolípidos, y iones calcio.
15. Un kit según la reivindicación 14, en el que la molécula activadora para inducir la generación de trombina es un iniciador de la vía extrínseca, en particular el factor tisular (TF) o un iniciador de la vía intrínseca, en particular vidrio, caolín, un ácido.
16. Un kit según la reivindicación 14, en el que la molécula activadora para inducir la generación de plasmina en el ensayo de la invención se selecciona de uroquinasa, estreptoquinasa, y activador tisular del plasminógeno y es, preferiblemente, el activador tisular del plasminógeno (tPA).
17. Un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que los sustratos son compuestos que en contacto con la molécula que se va a medir liberan un grupo medible.
18. Un kit según la reivindicación 14, 15 ó 16, en el que los sustratos son sustratos fluorescentes.

## ES 2 357 112 T3

19. Un kit según la reivindicación 18, en el que los sustratos tienen diferentes espectros de excitación y de emisión.

20. Un kit según la reivindicación 19, en el que el sustrato específico de la trombina está unido a 7-amino-4-metilcumarina.

5

21. Un kit según la reivindicación 19, en el que el sustrato específico de la trombina es Bz- $\beta$ -Ala-Gly-Arg-AMC-AcOH.

22. Un kit según la reivindicación 19, en el que el sustrato específico de la plasmina está unido a rodamina 110.

10

23. Un kit según la reivindicación 22, en el que el sustrato específico de la plasmina es la (bis-(amida de la CBZ-L-fenilalanil-L-arginina)).

15

20

25

30

35

40

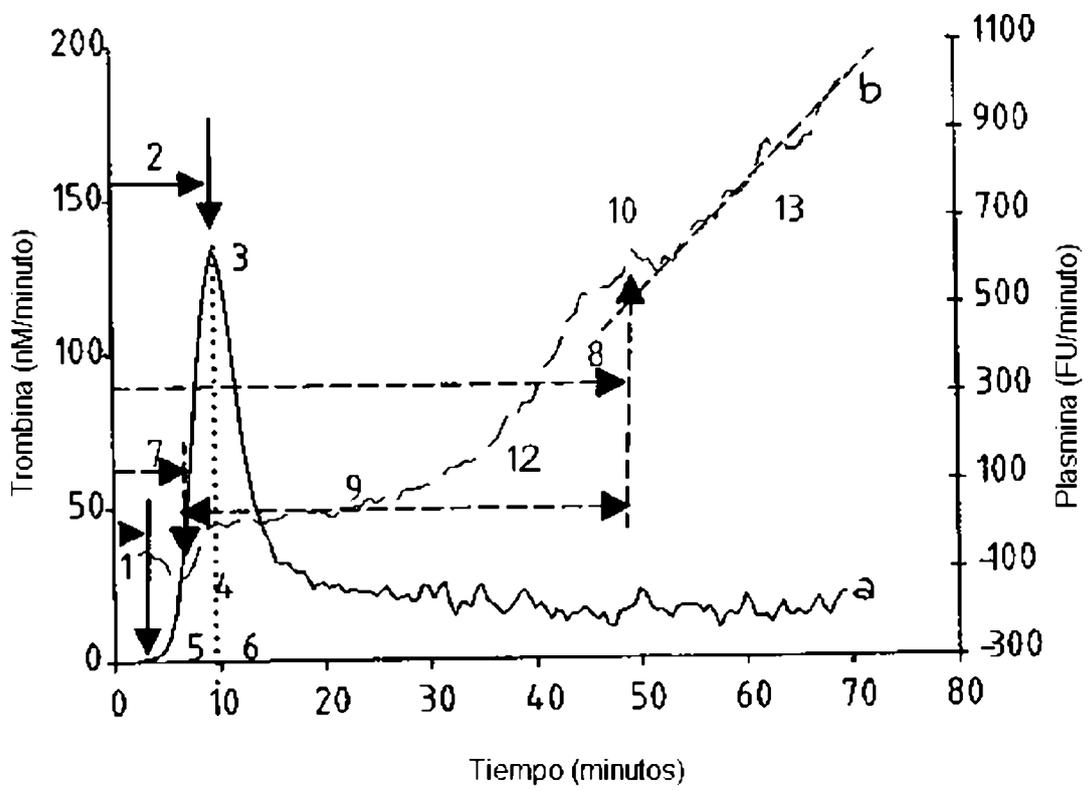
45

50

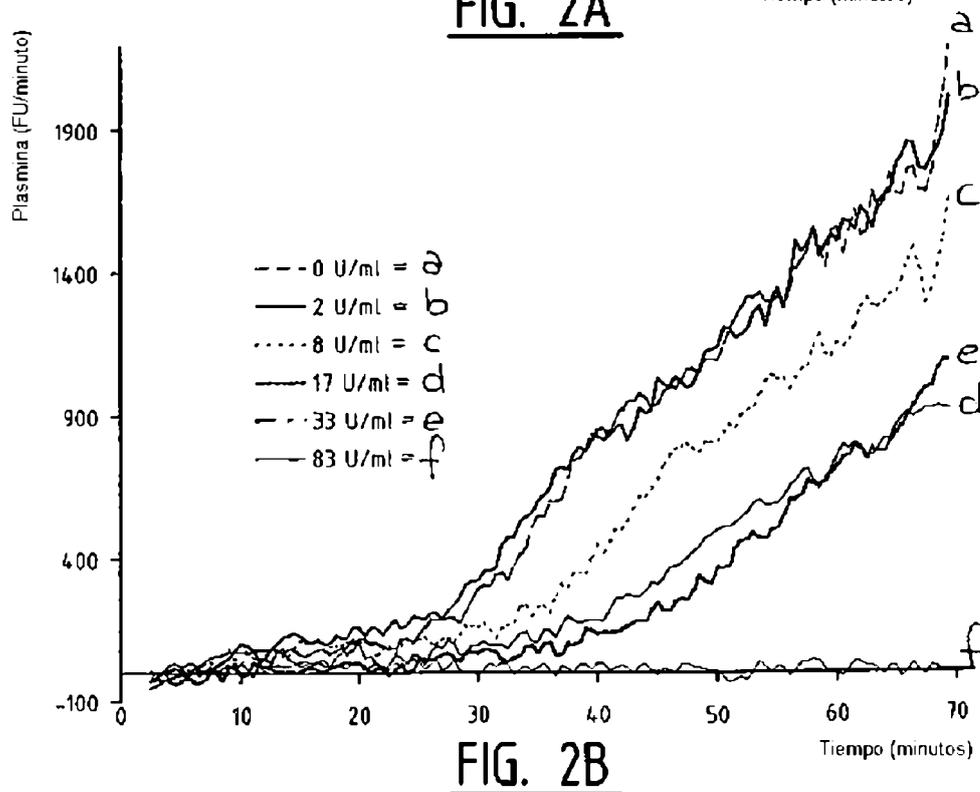
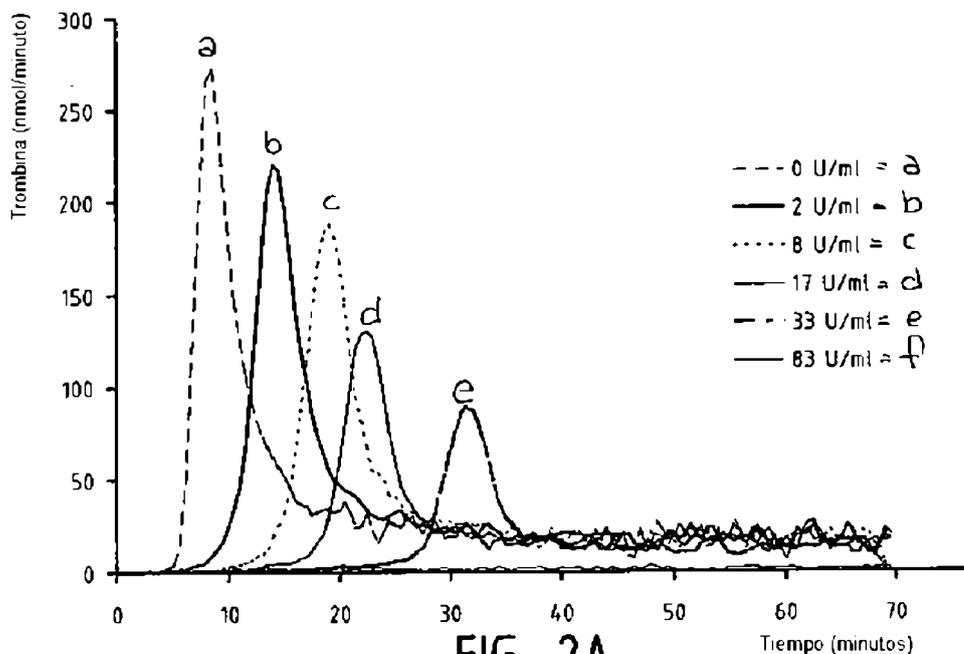
55

60

65



**FIG. 1**



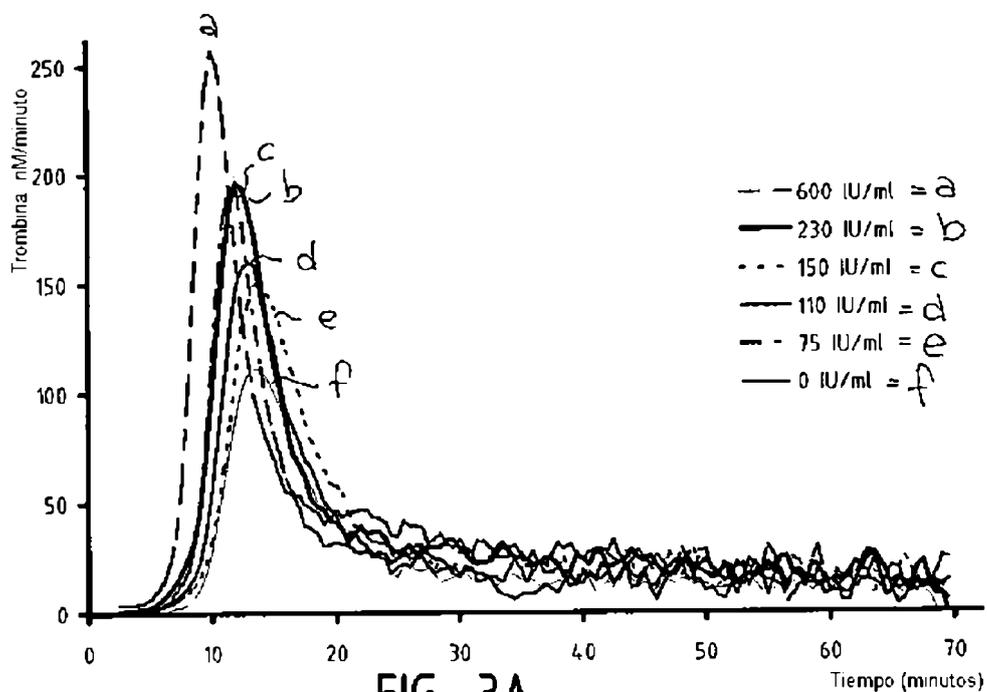


FIG. 3A

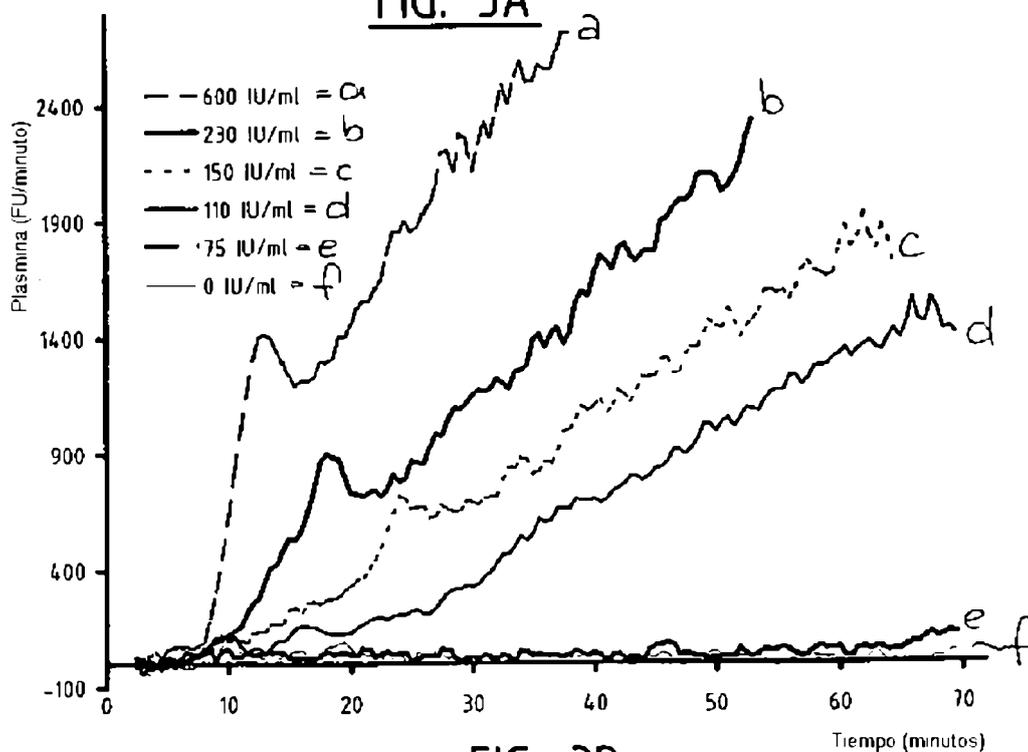


FIG. 3B

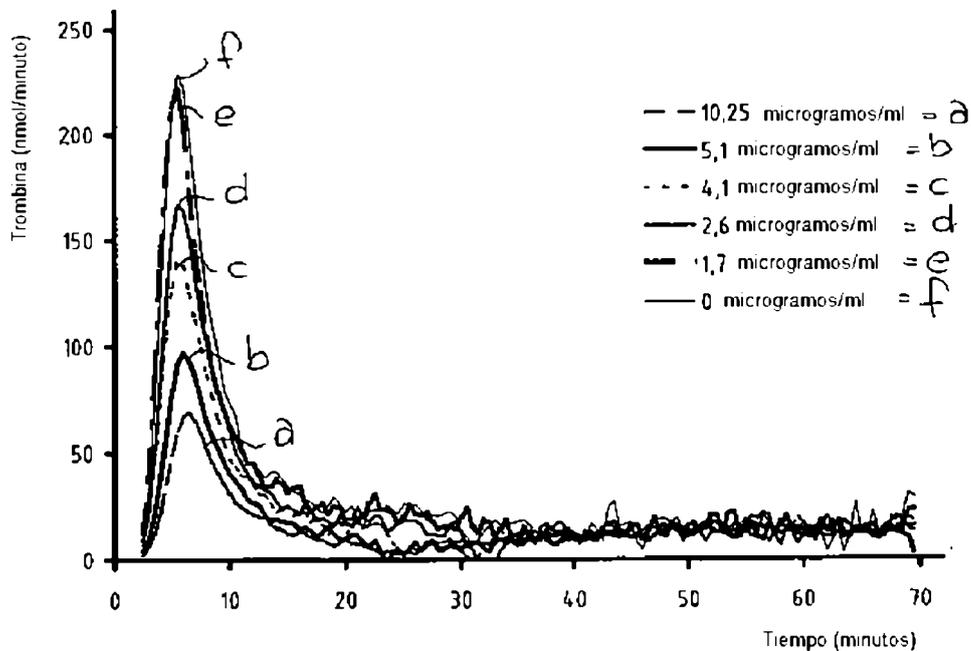


FIG. 4A

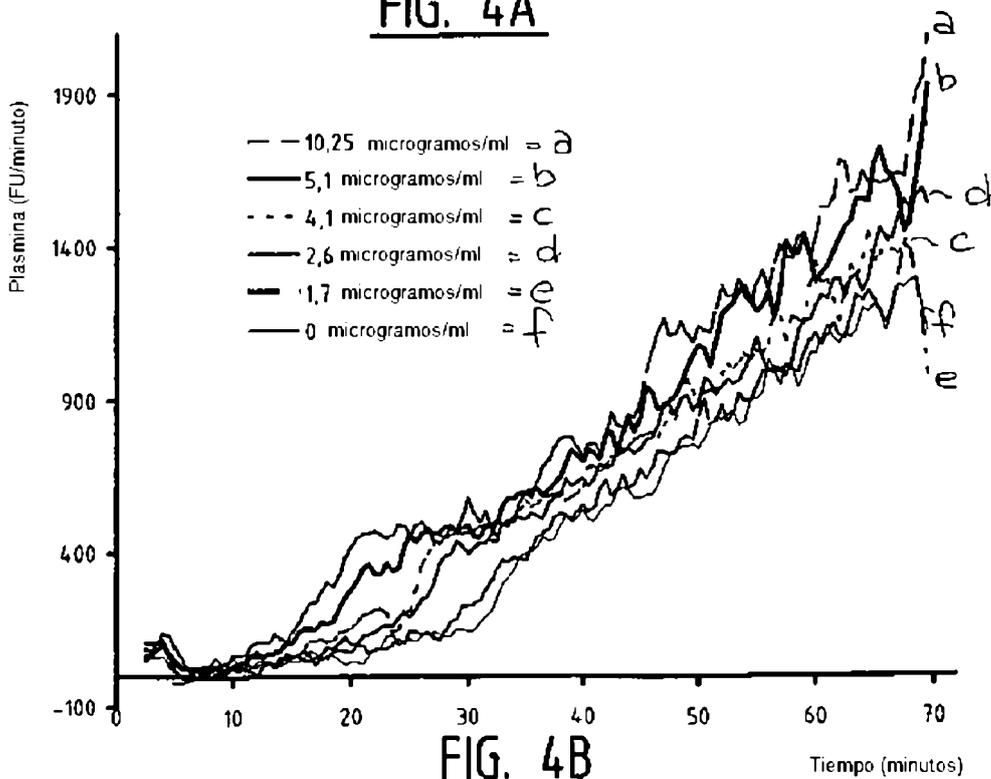
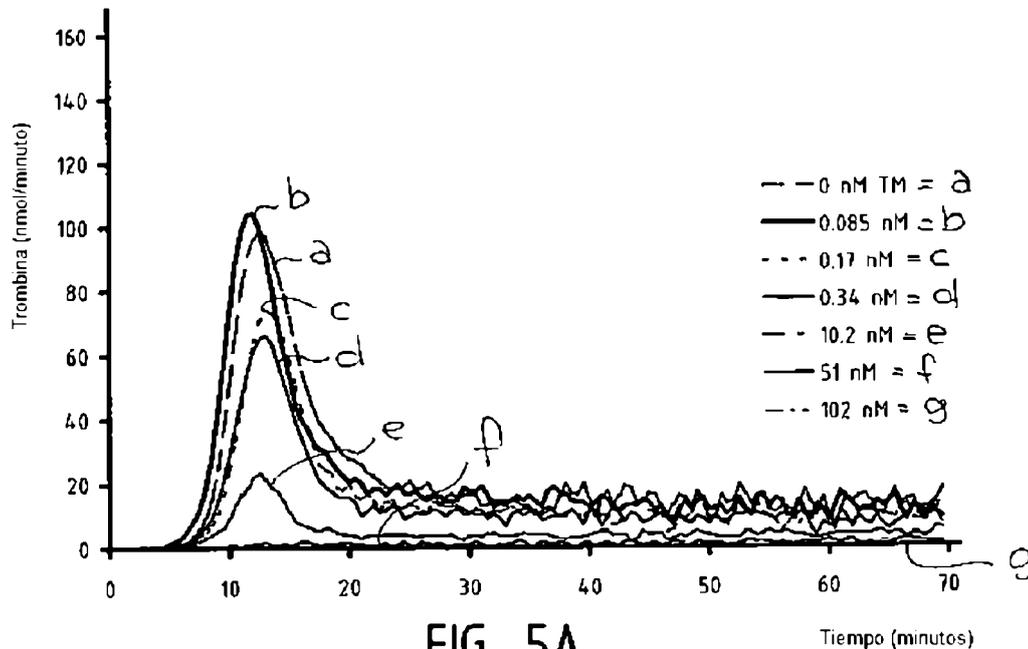
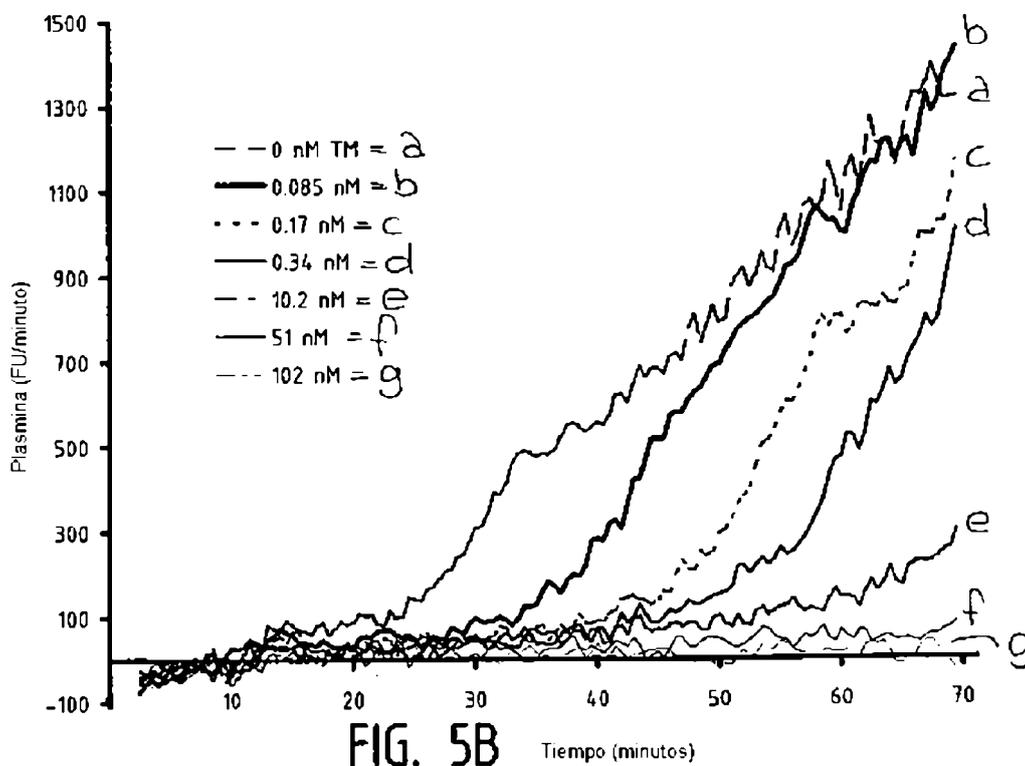


FIG. 4B



**FIG. 5A**



**FIG. 5B**

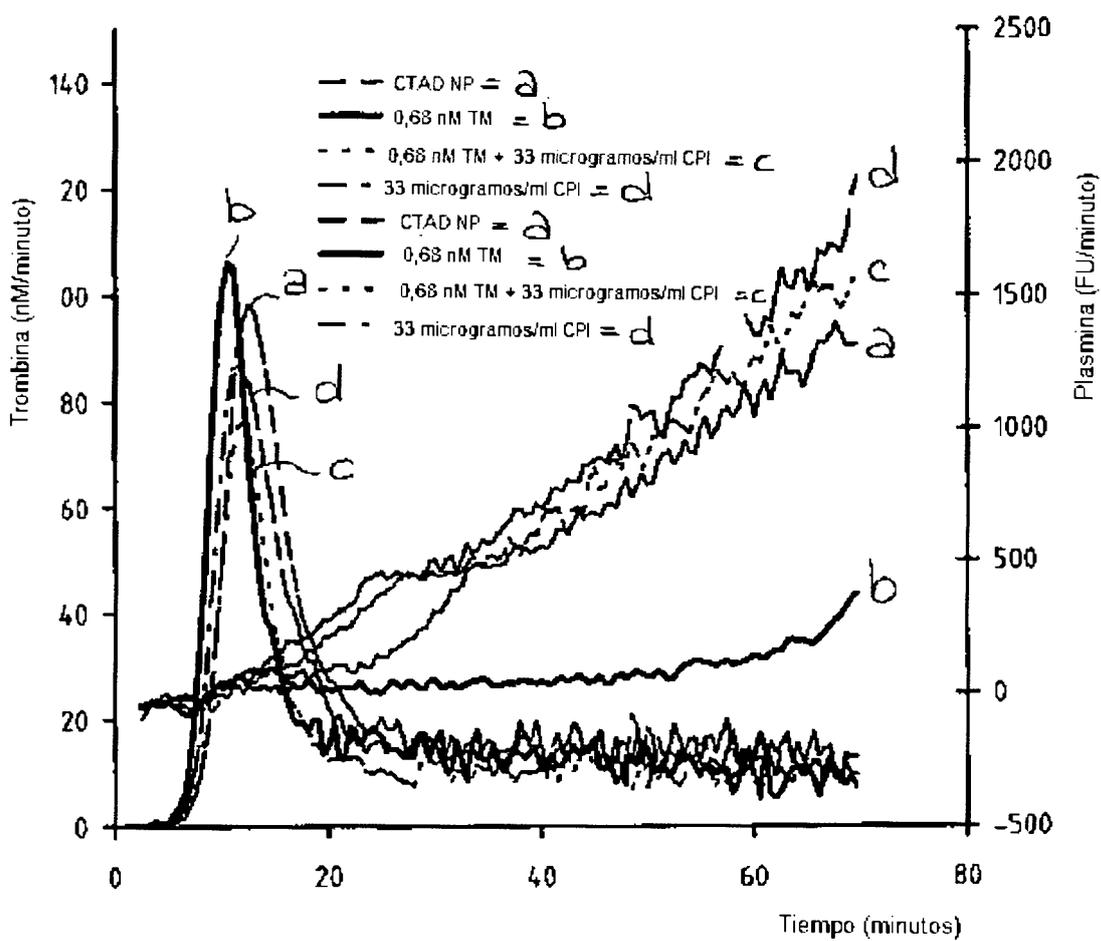
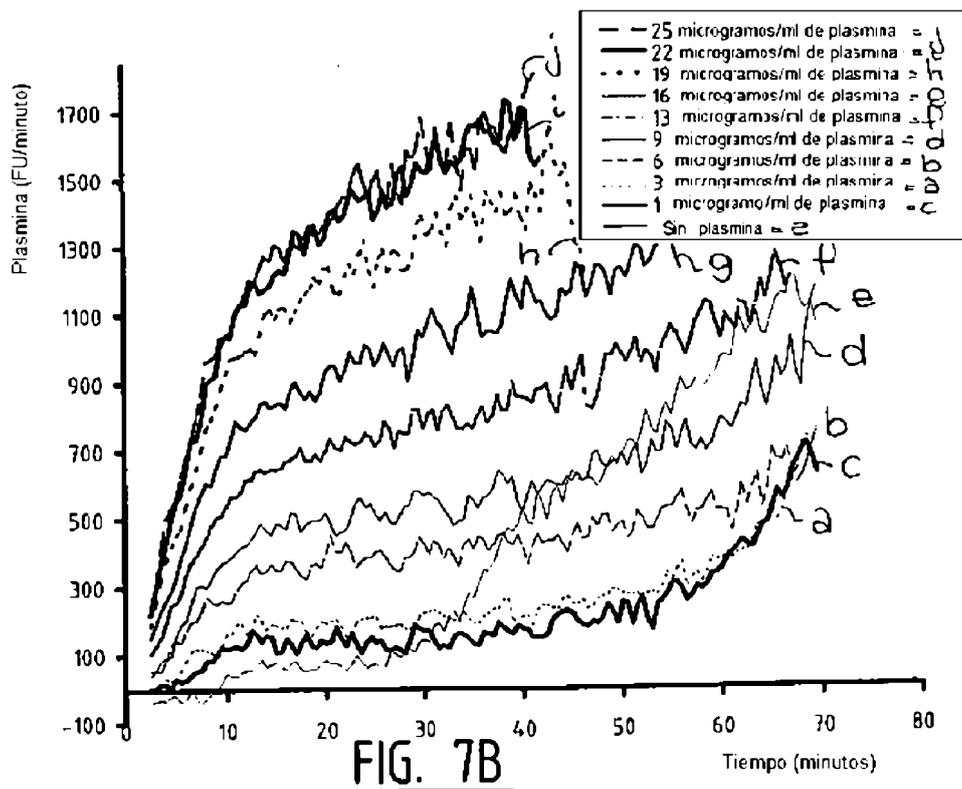
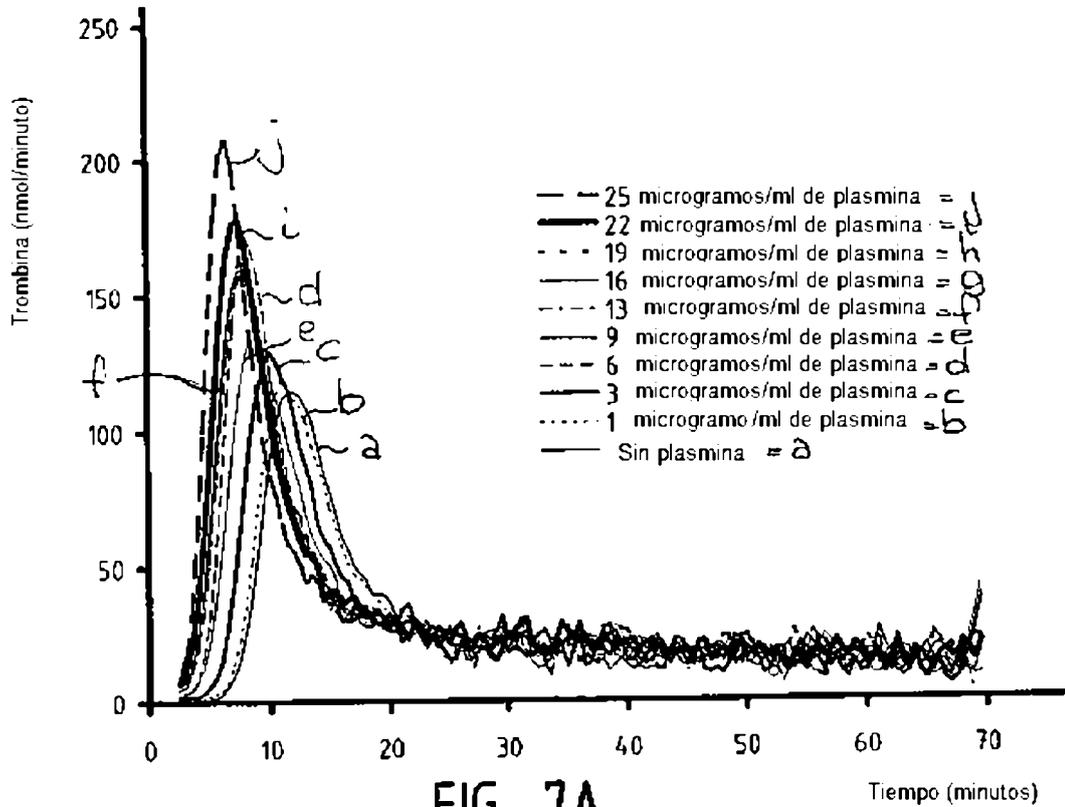


FIG. 6



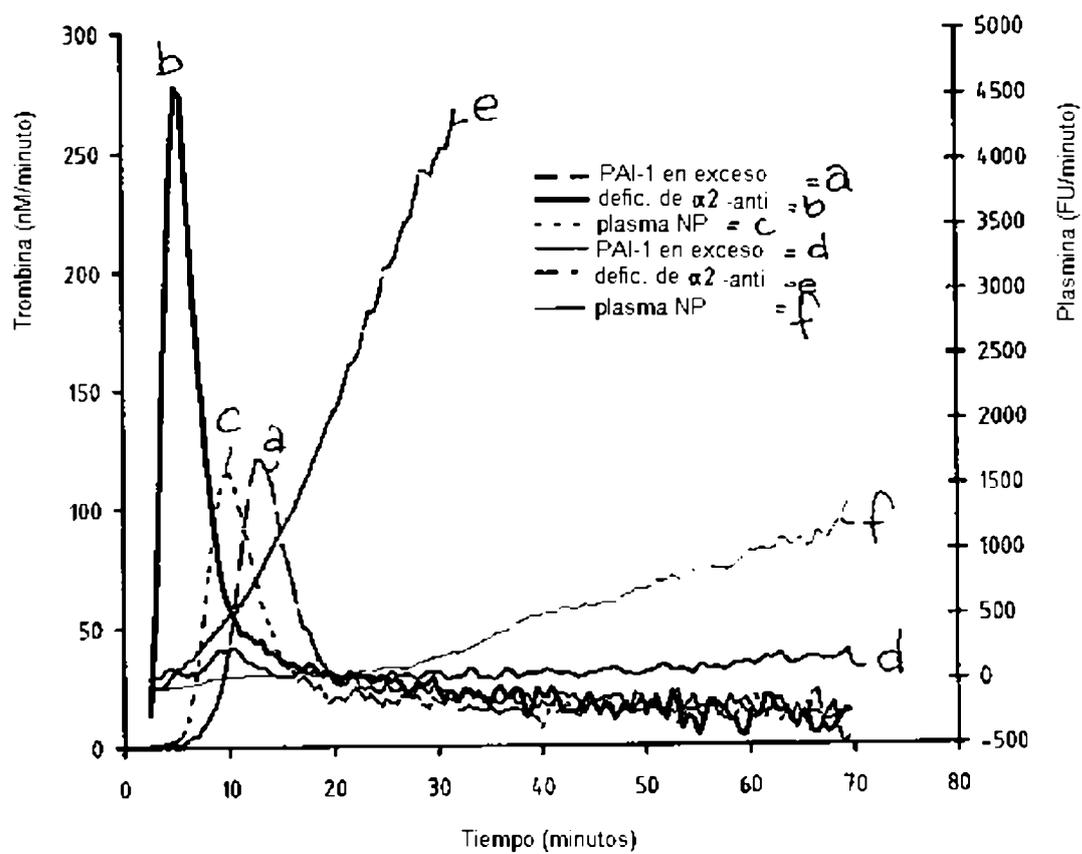
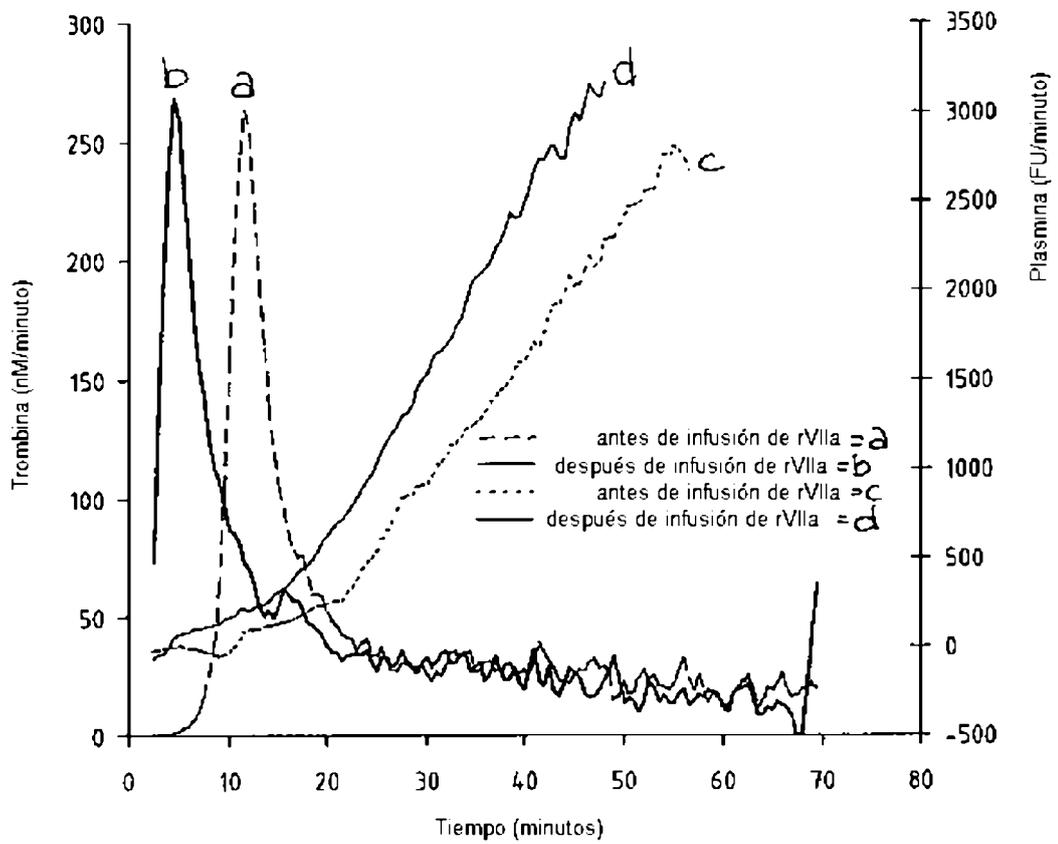


FIG. 8



**FIG. 9**

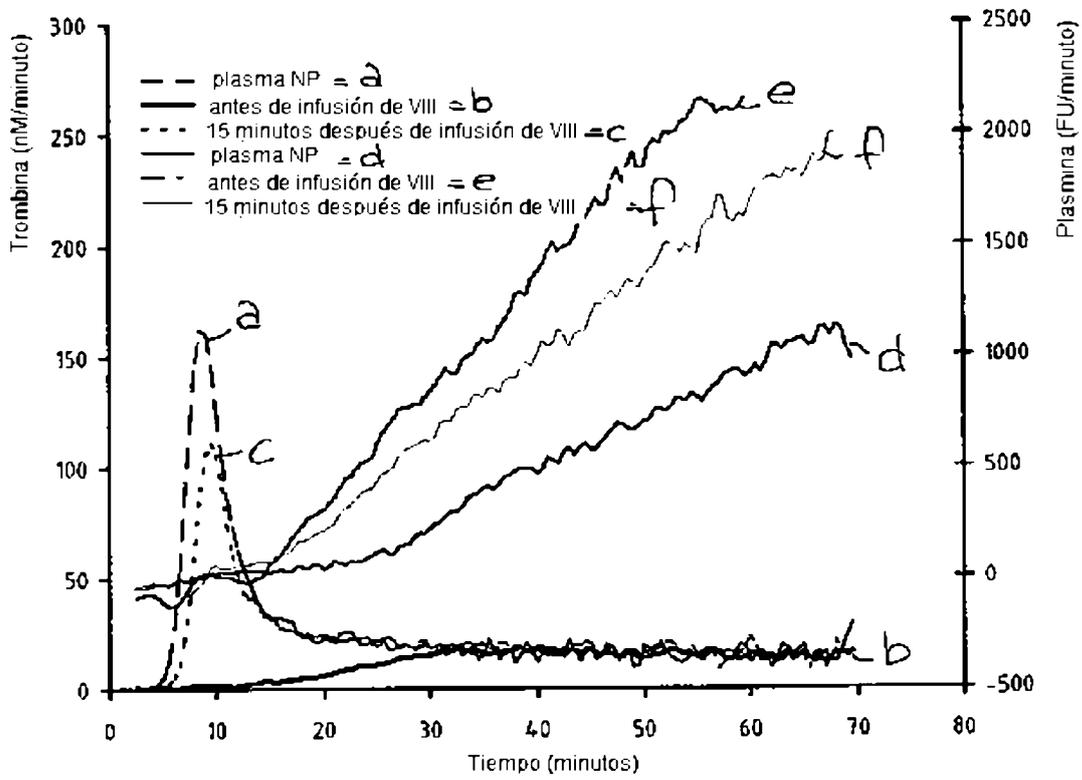


FIG. 10

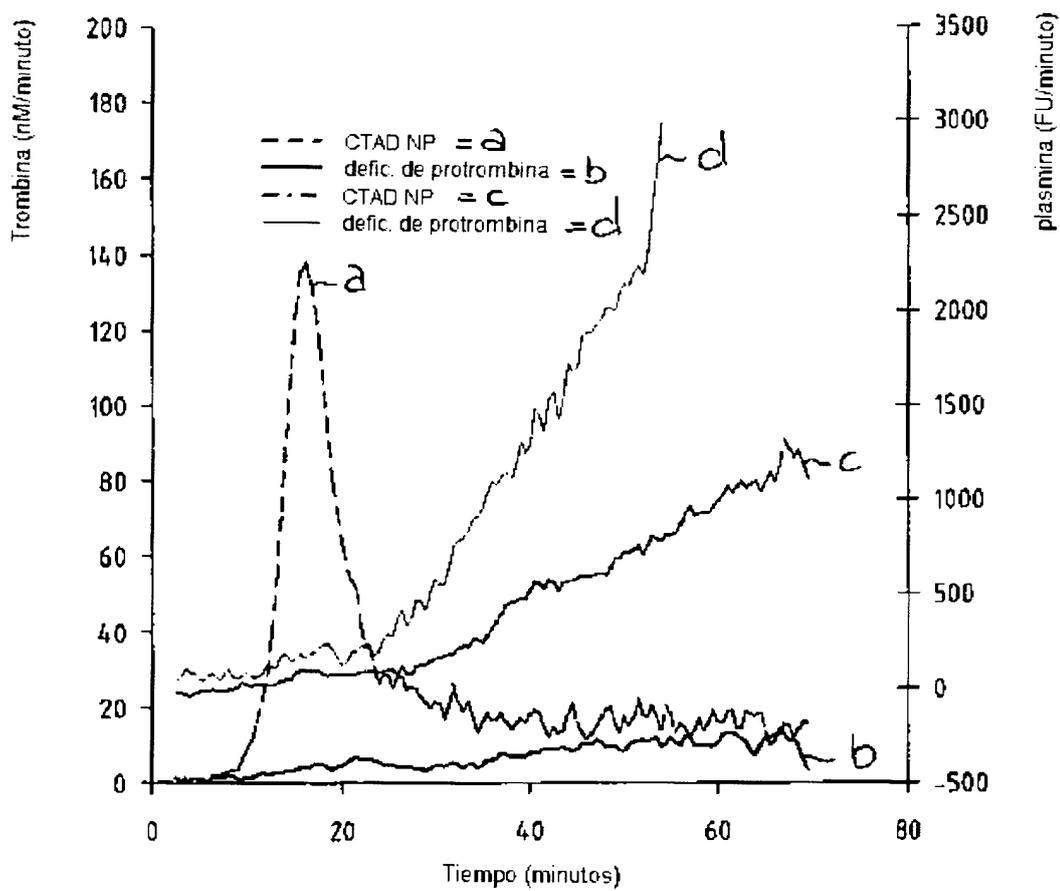


FIG. 11

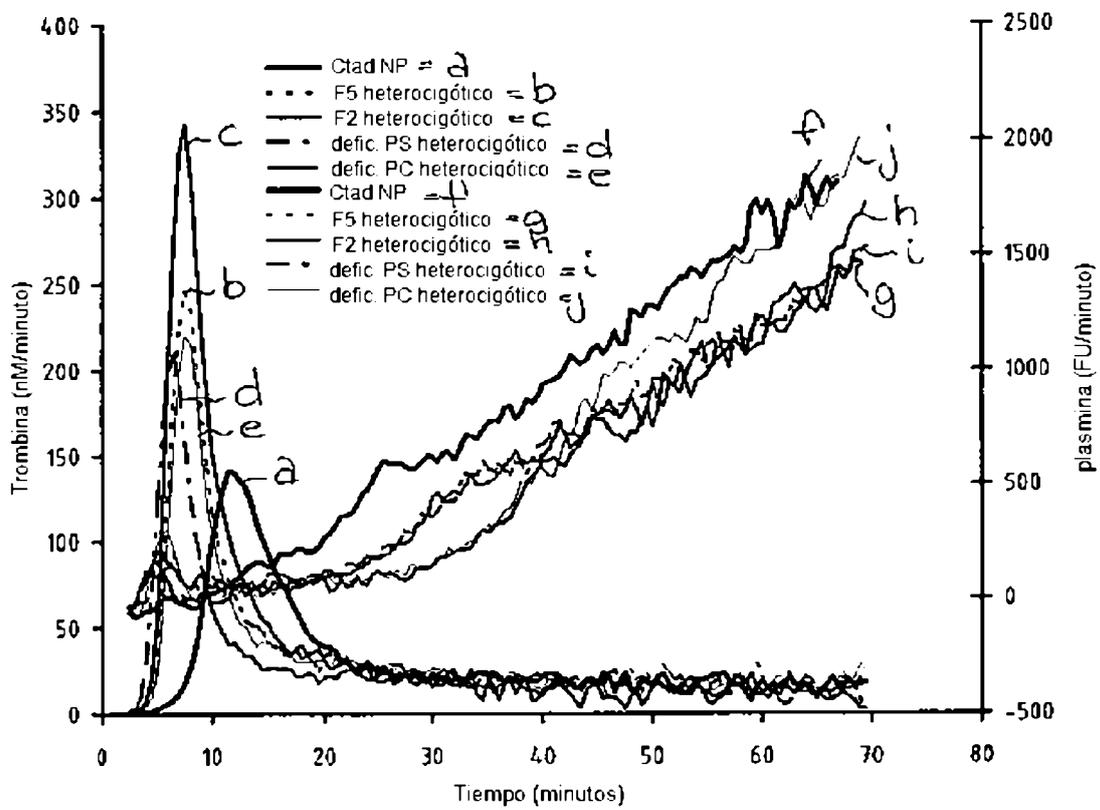


FIG. 12