



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 416**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**C12Q 1/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05027277 .2**  
96 Fecha de presentación : **14.12.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1684071**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Reactivo de ensayo cromógeno, estable, y su empleo en ensayos para el diagnóstico de la coagulación.**

30 Prioridad: **21.01.2005 DE 10 2005 003 145**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2011**

73 Titular/es: **SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS  
PRODUCTS GmbH  
Görzhäuser Hof Emil-von-Behring-Strasse 76  
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es: **Henckel, Thilo**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 361 416 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Reactivo de ensayo cromógeno, estable, y su empleo en ensayos para el diagnóstico de la coagulación.

La presente invención se refiere a un reactivo de ensayo cromógeno, que es adecuado de manera especial para ser empleado en ensayos de diagnóstico de la coagulación y que se caracteriza porque en estado líquido presenta una elevada estabilidad y, respectivamente, una elevada capacidad de conservación.

Un gran número de ensayos para diagnóstico está basado en el empleo de sustratos cromógenos. Para llevar a cabo la determinación de factores con actividad de proteasa, tal como por ejemplo por la determinación de los factores de la coagulación en muestras de sangre o en muestras de plasma, son empleados de manera usual sustratos peptídicos cromógenos, que están constituidos por una porción específica de oligopéptidos y respectivamente de polipéptidos y por una porción de cromóforos – (portadores de color). El sustrato peptídico cromógeno, que es inicialmente incoloro, se disocia en función de la cantidad y respectivamente de la actividad del factor proteolítico, que está contenido en la muestra, con lo cual es liberado el cromóforo, que puede ser medido entonces por vía fotométrica. En los documentos de patente EP 34 122 A1 y US 4,508,644 se ha descrito una pluralidad de sustratos peptídicos cromógenos y su empleo en ensayos para diagnóstico, por ejemplo para llevar a cabo la determinación de los factores de la coagulación factor IIa (trombina) y factor Xa. En el documento EP 78 764 A1 se ha descrito un procedimiento cromógeno para llevar a cabo la determinación del factor de la coagulación XIIa. En el documento EP 420 332 A2 se ha descrito un procedimiento cromógeno para llevar a cabo la determinación del factor de la coagulación IIa (trombina).

En el documento EP 0 408 075 A2 se describe un procedimiento para llevar a cabo la determinación de la antitrombina III en líquidos corporales. El reactivo de ensayo correspondiente contiene un sustrato peptídico cromógeno y un tetrapéptido (Gly-Pro-Arg-Pro) como inhibidor de la polimerización de la fibrina.

Los cromóforos, que son empleados de una manera especialmente frecuente son, por ejemplo, la para-nitroanilina (pNA) o el ácido 5-amino-2-nitro-benzoico (ANBA), cuyo color amarillo puede ser medido con una longitud de onda de  $\lambda = 405 \text{ nm}$ .

En el diagnóstico de la coagulación se lleva a cabo la determinación de la actividad de los factores enzimáticamente activos en muestras de sangre o en muestras de plasma, de manera usual, bajo condiciones tan parecidas como sea posible a las condiciones fisiológicas. Es especialmente importante que se garantice un valor del pH fisiológico de aproximadamente 7,4 en la preparación para el ensayo. Con objeto de impedir modificaciones del valor del pH en la preparación para el ensayo, están disueltas las substancias de ensayo, que tiene que ser mezcladas con la muestra de sangre y respectivamente con la muestra de plasma, de manera usual en tampones con un valor del pH neutro hasta ligeramente básico.

Desde luego, el inconveniente de un diseño del ensayo de este tipo consiste en que algunos componentes del ensayo presentan una estabilidad aminorada en medio neutro hasta básico. De este modo, por ejemplo la pNA presenta a un valor del pH de  $> 6,0$  una descomposición acelerada. La coloración amarilla resultante de la solución del sustrato de pNA imposibilita un empleo ulterior de la solución y, respectivamente, una evaluación fiable del ensayo. Por este motivo los sustratos de pNA son liofilizados usualmente para llevar a cabo su almacenamiento a largo plazo y solamente son disueltos en un líquido neutro cuando sea necesario. Con objeto de impedir la descomposición de los sustratos de pNA en soluciones, es conocido el hecho de ajustar en el intervalo ácido el valor del pH de la solución del sustrato.

Para diversos ensayos de la coagulación cromógenos es necesario llevar a cabo la activación de la cascada de la coagulación con formación de trombina o es necesario aportar directamente trombina a la preparación para el ensayo pero, sin embargo, hay que impedir al mismo tiempo la formación de un coágulo de fibrina con objeto de prevenir turbideces que perjudicarían la medición fotométrica de la muestra. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio del empleo de inhibidores de la polimerización de la fibrina en la preparación para el ensayo. Estos inhibidores, denominados Clot, están constituidos con frecuencia por oligopéptidos, que inhiben la asociación mutua (polimerización) de los monómeros de fibrina, que se forman bajo la acción de la trombina y, de ese modo, impiden la formación de coágulos (véase por ejemplo la publicación EP 0 456 152 B1).

Los criterios que deben tenerse en consideración a la hora de llevar a cabo el desarrollo de reactivos, que proporcionen los componentes, que son necesarios para un procedimiento de ensayo son, entre otros, una manipulación sencilla y una capacidad de conservación tan prolongada como sea posible. Son especialmente preferentes las formulaciones líquidas de reactivos, que sean estables a largo plazo puesto que, con ocasión de la reconstitución de los componentes liofilizados por parte del usuario, pueden producirse errores, que pueden tener un efecto negativo sobre la calidad del procedimiento de ensayo en su conjunto.

La presente invención tenía como tarea proporcionar un reactivo estable a largo plazo, especialmente en estado

líquido, que contuviese, tanto un sustrato peptídico cromógeno así como, también, un inhibidor Clot y que, por lo tanto, fuese especialmente adecuado para ser empleado en ensayos cromógenos de la coagulación, que son evaluados por vía fotométrica.

5 La solución de la tarea consiste en la puesta a disposición del procedimiento y de los objetos de conformidad con la invención, que están descritos en las reivindicaciones.

De manera esencial, la presente invención se refiere a una preparación líquida, que contiene un sustrato peptídico cromógeno y a un inhibidor de la polimerización de la fibrina, que está constituido por un oligopéptido, que inhibe la polimerización de los monómeros de fibrina, que se forman bajo la acción de la trombina y que, además, se caracteriza porque el valor del pH de la preparación se encuentra situado en el intervalo comprendido entre 3,0 y 6,0, de manera preferente se encuentra situado en el intervalo comprendido entre 4,0 y 5,0. En una forma de realización especialmente preferente, el valor del pH del reactivo es de  $4,6 \pm 0,1$ .

15 Para llevar a cabo el ajuste del valor de pH se aportan donadores de protones a la preparación líquida, acuosa, es decir que son aportados ácidos y, respectivamente, sus sales. Pueden ser empleados ácidos y, respectivamente, donadores de protones orgánicos o inorgánicos. Un sistema tampón adecuado puede ser necesario con objeto de garantizar un valor estable del pH y para impedir, por ejemplo, la alcalinización por parte del dióxido de carbono.

Una forma de realización especialmente preferente de una preparación, de conformidad con la invención, contiene iones acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ). Otro objeto de la presente invención consiste, por lo tanto, en un procedimiento para llevar a cabo la obtención de un reactivo de ensayo, según el cual se combinan un sustrato peptídico cromógeno y un inhibidor de la polimerización de la fibrina, que está constituido por un oligopéptido, que inhibe la polimerización de los monómeros de fibrina, que se forman bajo la acción de la trombina, y se ajusta el valor del pH del reactivo con ácido acético hasta un valor situado en el intervalo comprendido entre 3,0 y 6,0, de manera preferente se ajusta hasta un valor situado en el intervalo comprendido entre 4,0 y 5,0, de manera especialmente preferente se ajusta a un valor de  $4,6 \pm 0,1$ .

25 De manera sorprendente, una preparación de conformidad con la invención en estado líquido dispone de una elevada estabilidad y, por lo tanto, de una capacidad de almacenamiento más prolongada que la de una preparación correspondiente, con un valor de pH neutro en estado líquido o liofilizado.

Se ha podido observar que una preparación, de conformidad con la invención, en estado líquido presenta durante un periodo de tiempo de 60 semanas, a una temperatura de almacenamiento de  $4^\circ\text{C}$ , una desviación del valor de medición con respecto al valor inicial no mayor que un 10 %. Como valor inicial debe entenderse el valor de medición o el resultado del ensayo, que ha sido determinado por medio del empleo de la preparación como reactivo de ensayo el día de la obtención de la preparación, en un procedimiento de ensayo adecuado. Como procedimientos para llevar a cabo la determinación de la estabilidad de un reactivo, que contiene, por ejemplo, un sustrato peptídico cromógeno, que es disociado por la trombina, es adecuado, por ejemplo, un ensayo ETP (véase la publicación EP 0 420 332 B1 y, respectivamente, el ejemplo 2 indicado más adelante).

35 Los sustratos peptídicos cromógenos, en el sentido de la presente invención, están constituidos por una porción específica de oligopéptido y, respectivamente, de polipéptido, sobre la cual está acoplado un grupo cromógeno, es decir un grupo disociable, coloreado o fluorescente, que presente propiedades ópticas, tras la disociación del sustrato peptídico, diferentes de las del sustrato peptídico cromógeno no disociado y que puedan ser medidas por vía espectrofotométrica de absorción y, respectivamente, de fluorescencia. Ejemplos de grupos cromógenos, que pueden ser acoplados sobre el sustrato peptídico son la para-nitroanilina (pNA), el ácido 5-amino-2-nitro-benzoico (ANBA), la 7-amino-4-metoxicumarina (AMC), la quinolilamida (ChA), el éster de dimetilo del ácido 5-amino-isoftálico (DPA) y sus derivados.

45 El sustrato peptídico cromógeno puede ser elegido, desde el punto de vista de la porción oligopeptídica y, respectivamente, polipeptídica entre una pluralidad de sustratos, conocidos por el técnico en la materia, que son disociados por el factor de la coagulación que debe ser determinado tal como, por ejemplo, por el factor X/Xa o por la trombina. En una forma preferente de realización, el reactivo contiene un sustrato peptídico cromógeno, que es reconocido y transformado por la trombina tal como, por ejemplo, un sustrato peptídico con la secuencia Ala-Gly-Arg- $R_1$  o con la secuencia Gly-Gly-Arg- $R_1$ , significando  $R_1$  un grupo cromógeno. Los sustratos peptídicos especialmente preferentes, que son reconocidos y transformados por la trombina son, por ejemplo, el sustrato peptídico Ala-Gly-Arg-pNA acoplado con la pNA (Pefachrome®TG, Pentapharm Ltd., Basilea, Suiza) o el sustrato peptídico Gly-Gly-Arg-AMC acoplado con la AMC (Bachem). Otros sustratos peptídicos adecuados, que son disociados por la trombina, son aquellos de la fórmula general Msc-Val-Xaa- $R_1$ , en la que Msc significa metilsulfoniletiloxicarbonilo, Val significa el aminoácido constituido por la valina y Xaa significa un resto de aminoácido, que comprende un grupo guaninino terminal o un grupo ureido terminal, separado por al menos dos átomos de carbono de la estructura peptídica, y en la que  $R_1$  significa un grupo cromógeno, siendo especialmente preferente el péptido Msc-Val-Arg- $R_1$  y, respectivamente, el péptido Msc-Val-Arg-pNA (EP 0 802 986 B1). Otros ejemplos de sustratos peptídicos cromógenos con especificidad para diversas proteasas se encuentra, por ejemplo,

en la patente norteamericana US 4,508,644.

En una forma preferente de realización, la preparación puede contener además uno o varios estabilizantes tales como, por ejemplo, la albúmina de suero bovino, las sales caotrópicas, las chaperonas y sustancias similares a las chaperonas (chaperone-like), el dextrano y otros azúcares.

- 5 A título de inhibidores de la polimerización de la fibrina son adecuados los oligopéptidos, que inhiban la polimerización de los monómeros de fibrina, que se forman bajo la acción de la trombina, de manera especialmente preferente aquellos con la secuencia peptídica general GPRP-X-NH<sub>2</sub>, donde G significa el aminoácido constituido por la glicina, P significa el aminoácido constituido por la L-prolina, R significa el aminoácido constituido por L-arginina y X significa alanina o glicina (véase la publicación EP 0 465 152 B1).
- 10 La invención se refiere, por otra parte, al empleo de la preparación de conformidad con la invención como reactivo de ensayo en un procedimiento de ensayo para llevar a cabo la determinación de un parámetro de la coagulación en una muestra de sangre integral o en una muestra plasma. Como material de muestra son adecuados la sangre integral o el plasma, de origen humano o de origen animal. Es adecuado de una manera especialmente buena el plasma pobre en plaquetas o el plasma rico en plaquetas, que puede estar combinado con EDTA y/o con citrato.
- 15 Es preferente el empleo de una preparación de conformidad con la invención como reactivo de ensayo en un procedimiento de ensayo para llevar a cabo la determinación de la coagulación de la trombina en la sangre o en el plasma. Dichos procedimientos de ensayo están descritos, por ejemplo, en los documentos de las patentes EP 1 367 135 A1 y EP 0 420 332 B1. Es especialmente preferente el empleo del reactivo de conformidad con la invención en un procedimiento de ensayo para llevar a cabo la determinación del potencial endógeno de la trombina (ETP) y de otros parámetros de la coagulación, que pueden ser calculados a partir de la curva de la formación de la trombina o que pueden ser derivados a partir de la cinética medida de la conversión de un sustrato cromógeno de la trombina [véanse las publicaciones EP 0 420 332 B1, EP 0 802 986 B1 y Hemker et al. (1993) Thromb. Haemostasis 70: 617-624].
- 20 Por otra parte, es preferente el empleo de una preparación de conformidad con la invención como reactivo de ensayo en ensayos cromógenos para llevar a cabo la determinación del tiempo de la coagulación tal como, por ejemplo, en un ensayo cromógeno de coagulación del tiempo de la protrombina (PT) como se ha descrito en el documento de la patente EP 0 014 039 A1.
- 25

Otro objeto de la invención está constituido por un estuche de ensayo para llevar a cabo la realización de un procedimiento de ensayo cromógeno, conteniendo el estuche de ensayo, al menos, una preparación líquida, que contiene un sustrato peptídico cromógeno y un inhibidor de la polimerización de la fibrina, que está constituido por un oligopéptido, que inhibe la polimerización de los monómeros de fibrina, que se forman bajo la acción de la trombina, y que presenta un valor del pH situado en el intervalo comprendido entre 3,0 y 6,0. Un estuche de ensayo preferente para el empleo en un procedimiento de ensayo para el diagnóstico de la coagulación contiene, además, uno o varios activadores de la coagulación. Con objeto de inducir, por ejemplo, la formación de la trombina, el estuche puede contener, por ejemplo, soluciones o liofilizados, que contengan iones Ca<sup>2+</sup>, tromboplastina o activadores por contacto tal como, por ejemplo, el caolín, los fosfolípidos, el veneno de serpiente o la trombomodulina y proteína C activada.

30

35

Figuras.

Las figuras 1 a 3 son representaciones gráficas de los resultados de los ensayos (valores absolutos de medición), que han sido medidos con una preparación líquida ácida, de conformidad con la invención (pH 4,6) y, respectivamente con preparaciones neutras (pH 7,4).

40

Figura 1: almacenamiento de las preparaciones a + 4°C.

Figura 2: almacenamiento de las preparaciones a temperatura ambiente.

Figura 3: almacenamiento de las preparaciones a + 37°C.

45 Los ejemplos siguientes sirven para poner de manifiesto la invención y no deben ser entendidos como limitativos.

### Ejemplos.

**Ejemplo 1:** Obtención de un reactivo de conformidad con la invención.

Para llevar a cabo la obtención de un reactivo de ensayo, de conformidad con la invención, que sea adecuado para

5 ser utilizado en un procedimiento destinado a llevar a cabo la determinación de la actividad de la trombina, se disolvieron en agua desmineralizada H-β-Ala-Gly-Arg-pNA-2AcOH, secado por liofilización, a título de substrato cromógeno de la trombina (Pefachrome®, Pentapharm Ltd., Basilea, Suiza), H-Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-NH<sub>2</sub>, secado por liofilización (como sal del ácido triufluoroacético), a título de inhibidor Colt, NaCl, albúmina de suero bovino y dextrano y se ajustó el valor del pH de la solución con ácido acético hasta un valor de  $4,6 \pm 0,1$ . El reactivo se envasó por último en un recipiente para reactivos, que puede ser obturado, y se conservó en estado líquido.

10 Con fines comparativos se prepararon reactivos con un valor neutro del pH. Con esta finalidad se disolvieron en agua desmineralizada Msc-Val-Arg-pNA-2HCl, secado por liofilización, a título de substrato cromógeno de la trombina (Neosystem Groupe SNPE, Strasbourg, Francia) y H-Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-NH<sub>2</sub>, secado por liofilización (como sal del ácido trifluoroacético), a título de inhibidor Colt, NaCl, tris/HCl, albúmina de suero bovino y dextrano y se ajustó el valor del pH a 7,4. Una parte de ese reactivo neutro se envasó en un recipiente para reactivos, que puede ser obturado, y se conservó en estado líquido, mientras que la otra parte se transfirió a un recipiente para la liofilización, se secó por liofilización y se conservó como liofilizado.

15 **Ejemplo 2:** Empleo de un reactivo de conformidad con la invención en un procedimiento de ensayo para llevar a cabo la determinación del potencial endógeno de la trombina (ETP) después de un almacenamiento a largo plazo bajo diversas condiciones.

20 Con objeto de llevar a cabo la verificación de la estabilidad del reactivo líquido ácido, de conformidad con la invención, se almacenaron alícuotas del reactivo durante 96 semanas inclusive a 4°C, a la temperatura ambiente (RT, 15 – 25°C) y, respectivamente, a 37°C y se emplearon en un ensayo ETP al cabo de periodos diferentes de almacenamiento. Se procedió de manera análoga con las dos formulaciones neutras del reactivo de control.

Como material de muestra se utilizó en todos los ensayos una carga liofilizada de plasma humano pobre en plaquetas (conjunto de plasma normal), que se había descongelado en forma de alícuotas en el momento correspondiente del ensayo.

Con el reactivo ácido, de conformidad con la invención, se llevó a cabo un ensayo ETP de la siguiente manera:

25 Se mezclaron, en primer lugar, 135 µl de plasma con 40 µl de tampón (50 mM Tris-HCl, pH 7,4). A continuación se aportaron 40 µl del reactivo de conformidad con la invención. Al cabo de una incubación durante 7 minutos, fueron aportados a la preparación 15 µl de CaCl<sub>2</sub> (250 mM) y 30 µl de Innovin® (reactivo constituido por el factor tisular humano recombinante y por una mezcla de fosfolípidos sintéticos; Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania) para llevar a cabo la activación de la formación de la trombina. Durante un periodo de tiempo de 20 minutos se midió de manera continua la absorción de la preparación de ensayo a una longitud de onda de  $\lambda = 405$  nm. Por medio de la cinética de conversión, determinada de este modo, del substrato cromógeno de la trombina se determinó el valor ETP de la muestra con ayuda de un procedimiento de evaluación, que está descrito en la solicitud de patente DE 10 2004 059 055.9.

35 La formación de la mezcla de los reactivos con la muestra, la medición de la absorción y la determinación automática del valor ETP se llevaron a cabo de una manera completamente automática en un dispositivo analizador de la coagulación BCS® (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania).

Con los reactivos neutros de control se llevó a cabo un ensayo ETP de la siguiente manera (véase también la publicación EP 420 332 B1):

40 El reactivo liofilizado se disolvió de nuevas con agua desmineralizada en el momento correspondiente del ensayo. Se mezclaron 200 µl de plasma con 80 µl del reactivo líquido neutro y, respectivamente, con 80 µl del reactivo liofilizado recién reconstituido. Al cabo de una incubación durante 7 minutos se aportaron a la preparación 30 µl de CaCl<sub>2</sub> (250 mM) y 60 µl de Innovin® (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania) para llevar a cabo la activación de la formación de la trombina. La medición de la absorción y la determinación del valor ETP se llevaron a cabo como se ha descrito más arriba.

45 Los resultados de los ensayos están representados gráficamente en las figuras 1 a 3 en función de la duración del almacenamiento de los reactivos a diversas temperaturas de almacenamiento 4°C (figura 1), temperatura ambiente (15 – 25°C) (figura 2) y respectivamente 37°C (figura 3).

50 Tal como se desprende de las figuras, la formulación del reactivo, de conformidad con la invención, se caracteriza por una elevada estabilidad durante un periodo de hasta 60 semanas inclusive. A todas las temperaturas de almacenamiento y en cualquier instante, la desviación máxima con respecto al valor inicial, que fue medido en el instante  $t = 0$  (día de la preparación), se encuentra claramente por debajo de un 10 %, de manera preponderante se encuentra, incluso, por debajo del 5 %. La formulación neutra del reactivo, liofilizada, proporcionó al cabo de un almacenamiento durante 60 semanas, a 4°C, una desviación del valor de medición con respecto al valor inicial

mayor que un 10 % y a una temperatura de almacenamiento elevada (37°C), el valor de medición se desvió ya al cabo de 4 semanas en un 15 % inclusive. La formulación neutra líquida del reactivo mostró a todas las temperaturas de almacenamiento oscilaciones muy grandes de hasta más de un 20 % inclusive y por lo tanto no es estable. La capacidad e conservación del reactivo neutro líquido está limitada a un máximo de dos días.

5 En la tabla 1 se han indicado las desviaciones en porcentaje con respecto al correspondiente valor inicial  $t_0$  de las diversas formulaciones del reactivo, según diversas condiciones de almacenamiento. Las diversas formulaciones del reactivo se almacenaron durante un periodo de tiempo de hasta 96 semanas inclusive a una temperatura situada en el intervalo comprendido entre 2 y 8°C, a la temperatura ambiente y, respectivamente, a 37°C. A una temperatura de almacenamiento situada en el intervalo comprendido entre 2 y 8°C, los valores de medición, que fueron  
 10 determinados con una preparación de conformidad con la invención durante todo el periodo de tiempo (líquido, pH 4,6) no se desviaron más de un 5 %. A todas las temperaturas de almacenamiento del ensayo, la preparación líquida ácida mostró las desviaciones mínimas y, por lo tanto, la máxima estabilidad. En el caso de la preparación líquida neutra (líquido, pH 7,4) se puso de manifiesto, a medida que avanzó el periodo de almacenamiento a la temperatura ambiente y respectivamente a 37°C, una coloración amarilla del reactivo, cada vez mayor.

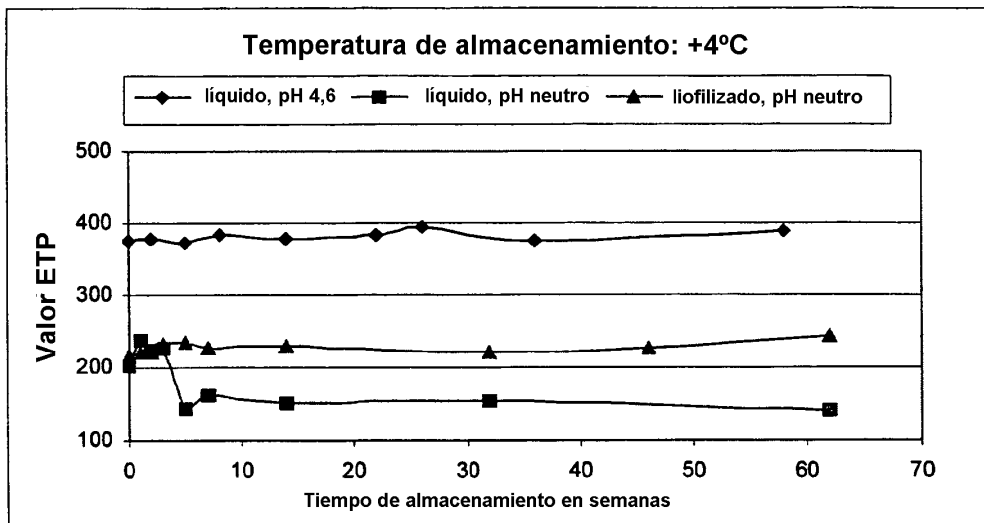
15 Tabla 1

Desviación con respecto al valor inicial en porcentaje [%]														
Temperatura de almacenamiento [°C]	Tiempo t [Semanas]	1	2	5	7	8	14	26	32	36	46	58	82	96
2-8 °C	Líquido, pH 4,6		0	1		-2	0	-5		0		-4	3	0
	Líquido, pH neutro	-17	-12	29	20		25		24					
	Liofilizado, pH neutro	-2	-3	-8	-5		-5		-2		-5			
Temperatura ambiente	Líquido, pH 4,6		-1	-3		-5	-1	-7		0				
	Líquido, pH neutro	-22	-14	-19	-13		-90		-13		-2			
	Liofilizado, pH neutro	-9	-7	-5	-8		-2		-12		27			
37 °C	Líquido, pH 4,6		-3	1		-3	-2	-1		-4		1		
	Líquido, pH neutro	-20	-13	-13	2		18		36					
	Liofilizado, pH neutro	-14	-1	-10	-4		-8		-6		-8			

## REIVINDICACIONES

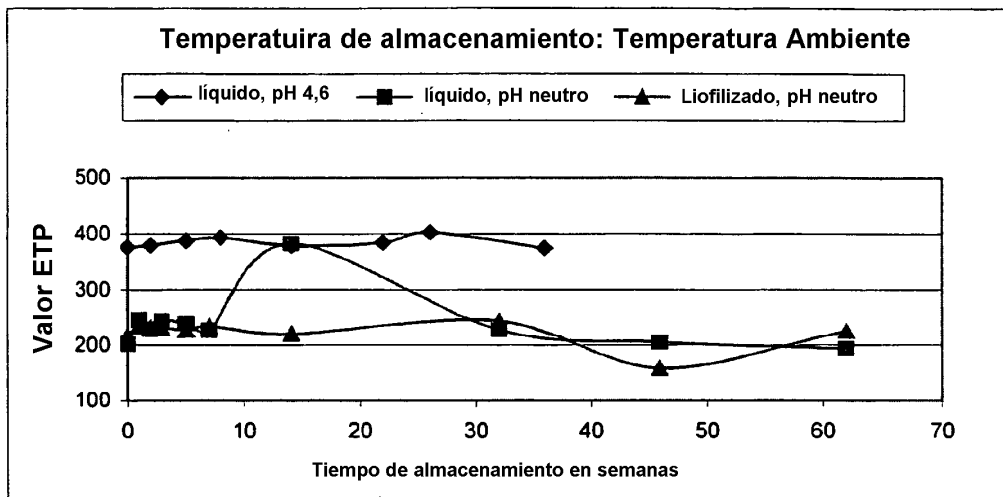
1. Preparación líquida, que contiene
  - a) un sustrato peptídico cromógeno y
  - b) un inhibidor de la polimerización de la fibrina, que está constituido por un oligopéptido, que inhibe la polimerización de los monómeros de fibrina, que se forman bajo la acción de la trombina, caracterizada porque el valor del pH de la preparación se encuentra situado en el intervalo comprendido entre 3,0 y 6,0.
2. Preparación según la reivindicación 1, caracterizada porque están contenidos iones acetato.
3. Preparación según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque está contenido un sustrato peptídico acoplado con la para-nitroanilina a título de sustrato peptídico cromógeno.
4. Preparación según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque está contenido un sustrato peptídico acoplado con el ácido 5-amino-2-nitro-benzoico a título de sustrato peptídico cromógeno.
5. Preparación según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque está contenido un sustrato peptídico cromógeno, que es disociado por la trombina.
6. Preparación según la reivindicación 5, caracterizada porque está contenido un sustrato peptídico cromógeno con la secuencia Ala-Gly-Arg-R<sub>1</sub>, significando R<sub>1</sub> un grupo cromógeno.
7. Preparación según la reivindicación 5, caracterizada porque está contenido un sustrato peptídico cromógeno con la secuencia Msc-Val-Arg-R<sub>1</sub>, significando Msc metilsulfoniletiloxicarbonilo y significando R<sub>1</sub> un grupo cromógeno.
8. Preparación según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque está contenido un inhibidor de la polimerización de la fibrina con la secuencia peptídica general GPRP-X-NH<sub>2</sub>, significando G el aminoácido constituido por la glicina, P el aminoácido constituido por la L-prolina, R el aminoácido constituido por la L-arginina y X significa alanina o glicina.
9. Preparación según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque están contenidos adicionalmente uno o varios estabilizantes.
10. Procedimiento para la obtención de una preparación según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el valor del pH de la preparación se ajusta a un valor situado en el intervalo comprendido entre 3,0 y 6,0 por medio de la adición de un donador de protones.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque el valor del pH de la preparación se ajusta a un valor situado en el intervalo comprendido entre 3,0 y 6,0 por medio de la adición de ácido acético.
12. Empleo de la preparación según una de las reivindicaciones 1 a 9 como reactivo de ensayo en un procedimiento de ensayo para llevar a cabo la determinación de un parámetro de la coagulación en una muestra de sangre integral o en una muestra de plasma.
13. Empleo de una preparación según una de las reivindicaciones 1 a 9 como reactivo de ensayo en un procedimiento para llevar a cabo la determinación de la generación de trombina en una muestra de sangre integral o en una muestra de plasma.
14. Empleo de una preparación según una de las reivindicaciones 1 a 9 como reactivo de ensayo en un procedimiento de ensayo para llevar a cabo la determinación del potencial endógeno de la trombina de una muestra de sangre integral o de una muestra de plasma.
15. Estuche de ensayo para llevar a cabo la realización de un procedimiento de ensayo cromógeno, caracterizado porque contiene una preparación según la reivindicación 1.

Figura 1





**Figura 2**



**Figura 3**

