



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 210**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

C07K 4/00 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01983998 .4**

96 Fecha de presentación : **18.10.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1337858**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2003**

54

Título: **Un reactivo y un estuche para determinar la coagulabilidad global y potencial hemostático.**

30

Prioridad: **27.10.2000 US 698589**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2011

73

Titular/es: **Cambridge University Hospitals NHS
Foundation Trust
Hills Road
Cambridge CB2 2QQ, GB**

72

Inventor/es: **Tejidor, Liliana;
Baglin, Trevor;
Doobay, Hema;
Luddington, Roger y
Fischer, Timothy, J.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 363 210 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

Un reactivo y un estuche para determinar la coagulabilidad global y el potencial hemostático.

5 **Campo de la invención**

La invención se dirige a un reactivo y un estuche para determinar si un paciente es hipercoagulable, hipocoagulable o normal en una sola prueba sobre una muestra procedente del paciente. La invención permite determinar globalmente tanto el potencial hipercoagulable como el potencial hipocoagulable de un paciente en un solo ensayo.

10

Antecedentes de la invención

La hemostasis es todo el proceso fisiológico para mantener la sangre en estado fluido dentro de vasos sanguíneos intactos y prevenir la pérdida de sangre excesiva al detener el flujo a través de la formación de un tapón hemostático. La hemostasis normal se mantiene mediante interacciones estrechamente reguladas de la pared de los vasos sanguíneos, las plaquetas de la sangre y las proteínas del plasma sanguíneo. Bajo condiciones normales, hay un delicado equilibrio entre los componentes individuales del sistema hemostático. Cualesquiera perturbaciones en este equilibrio hemostático, el potencial hemostático, podrían dar como resultado hemorragia o trombosis, Figura 1. Por “potencial hemostático” se entiende la capacidad para mantener un equilibrio entre los estados procoagulante y anticoagulante, según se mide por la polimerización de fibrina, cuando la coagulación es iniciada por un accionador o activador.

Una tendencia trombotica (trombofilia) resulta de la generación de actividad de trombina en exceso y polimerización de fibrina y formación de coágulos incrementadas (hipercoagulabilidad) mientras que una tendencia a hemorragias (hemofilia) resulta de una generación de trombina insuficiente y una polimerización de fibrina y formación de coágulos reducidas (hipocoagulabilidad). Todavía no existe un solo parámetro de laboratorio que se incremente en todas las formas de hipercoagulabilidad y disminuya en todas las forma de hipocoagulabilidad. Esto se debe en parte a factores distintos al plasma que representan un papel en la hemostasis. Según se describió anteriormente, estos otros factores incluyen la pared de los vasos sanguíneos y las plaquetas. Sin embargo, grandes proporciones de los trastornos hemostáticos están relacionadas con defectos o deficiencias en las proteínas de la sangre que constituyen el sistema de coagulación. Estas proteínas son responsables de la estabilización del tapón plaquetario mediante la formación de fibrina. Por lo tanto, una medida global de la contribución del plasma a la coagulación facilitaría la investigación de pacientes con hemostasis alterada.

La trombofilia y la hemofilia pueden ser congénitas o adquiridas. Las formas congénitas tienen una base genética y por lo tanto no se corrigen fácilmente. Las formas adquiridas resultan generalmente de cambios ambientales, a menudo el efecto de fármacos, y por lo tanto son susceptibles de manipulación. Por ejemplo, un individuo normal al que se administra warfarina desarrolla hemofilia adquirida, interrumpir la warfarina elimina la afección. Un individuo normal al que se administra una alta dosis de estrógeno desarrolla trombofilia adquirida, interrumpir el estrógeno elimina la afección. La base fundamental de las trombofilias y hemofilias tanto congénitas (genéticas) como adquiridas (ambientales) es un cambio bien en la cantidad o bien en la actividad de uno o más compuestos clave de la ruta de la coagulación. Por ejemplo, la forma hereditaria más comúnmente reconocida de trombofilia es una mutación en el gen del factor V que da como resultado la producción de una proteína del factor V estructuralmente alterada (Factor V Leiden) que es resistente a la segmentación enzimática por proteína C, un componente regulador crítico. La hemofilia A clásica se debe a una mutación en el gen del factor VIII que da como resultado bien una producción reducida de factor VIII o bien una producción de una proteína del factor VIII estructuralmente alterada que no funciona correctamente. En contraste con las trombofilias y hemofilias congénitas, las formas adquiridas no resultan de una estructura alterada sino en cambio de una alteración de la cantidad de un componente clave, típicamente más de uno, en un momento. Por ejemplo, el efecto trombofílico del estrógeno se debe a los efectos combinados de un aumento en los factores XI, IX, VIII, II y fibrinógeno y una reducción en la proteína S anticoagulante. El efecto hemofílico de la warfarina se debe a una reducción en los factores II, VII, IX y X. La Figura 2 ilustra los diversos estados de coagulabilidad y lista ejemplos de ensayos usados para determinar el grado o la presencia de un desequilibrio. Hoy día no existe un ensayo que pueda usarse para determinar tanto la hiper como la hipocoagulabilidad simultáneamente. Esto se debe en parte a la complejidad del procedimiento de coagulación, la interdependencia de los diversos componentes y la identificación de un medio para verificar el potencial hemostático de todo el sistema de coagulación. La Figura 3 presenta una visión de conjunto del proceso de coagulación. El proceso puede dividirse en cuatro fases dependientes, (1) la fase de iniciación, (2) la fase de propagación, (3) la fase de amplificación y (4) la fase de polimerización. Todas las fases están afectadas por procesos reguladores y de retroalimentación denominados rutas anticoagulantes.

La iniciación o el accionamiento de la coagulación se produce mediante la exposición de factor tisular debido a daño vascular, ruptura de la placa o expresión de monocitos como resultado de la inflamación. Cantidades traza de FVIIa y factor tisular forman el complejo Xasa extrínseca. Este complejo potencia la actividad catalítica de VIIa hacia factores X y IX dando como resultado la formación de las enzimas activas Xa y IXa. El factor Xa generado por el complejo Xasa extrínseca forma una pequeña cantidad de trombina (IIa). La trombina generada es capaz de activar pequeñas cantidades de los cofactores VIII y V. In vivo, el complejo Xasa extrínseca es rápidamente desactivado por el inhibidor del factor de la ruta tisular, TFPI, a través de la formación de un complejo cuaternario que consiste en TF, VIIa y Xa. Bajo condiciones fisiológicas la Xasa extrínseca genera cantidades solo picomolares de trombina.

ES 2 363 210 T3

Durante la fase de propagación de la coagulación, el papel de la Xasa extrínseca se minimiza y Factor Xa es generado alternativamente por el complejo de las enzimas IXa y su cofactor VIIIa. Este complejo enzimático se denomina Xasa intrínseca. La formación del Xa por el complejo Xasa intrínseca es aproximadamente 50 veces más eficaz que por la Xasa extrínseca. El Factor Xa y su cofactor activado, FVa, forman un complejo sobre la superficie de plaquetas activadas. Este es un catalizador eficaz para la conversión de protrombina en trombina, denominada el complejo protrombinasa. La trombina formada a través del complejo Xasa intrínseca es capaz de amplificar su propia producción mediante retroalimentación positiva (activación). La trombina activa los Factores VIII y V y la activación del Factor XI conduce a una producción adicional del componente enzimático de Xasa intrínseca (Factor IXa). La producción normal de trombina está altamente regulada y localizada. El TFPI neutraliza el accionamiento para la generación de trombina. Las proteasas activas (IIa, Xa, IXa) deben ser desactivadas por inhibidores de proteasa para evitar la trombosis diseminada. Uno de los más significativos de estos inhibidores es antitrombina III (ATIII). Tanto la trombina como el Xa, y en una menor extensión IXa liberado de superficies de membranas, son rápidamente inhibidos por ATIII. La trombina también puede unirse a subendotelio no dañado a través de una molécula receptora, la trombomodulina (TM). La formación del complejo IIa/TM cambia la especificidad de sustrato de la trombina de un procoagulante a un anticoagulante. La trombina unida a TM es un potente activador de proteína C, convirtiéndola en la enzima activa proteína C activada (APC). La APC junto con su cofactor proteína S segmenta los cofactores activados FVIIIa y FVa dando sus formas inactivas, FVIIIi y FVi. La trombomodulina también acelera la desactivación de trombina por ATIII.

La formación de trombina conduce finalmente a la segmentación de fibrinógeno para formar fibrina. Durante la fase de polimerización, la reticulación de hebras de fibrina solubles está mediada por Factor XIIIa, una enzima generada por activación de trombina. El complejo trombina-TM activa la procarboxipeptidasa inhibidor de la fibrinolisis activado portrombina (TAFI). Así, la trombina representa un papel durante esta fase al influir tanto en la arquitectura como en la estabilización del coágulo de fibrina. La trombina es una enzima clave y un efector del proceso de coagulación. La trombina es tanto un procoagulante como un anticoagulante potente. Sin embargo, es la capacidad de la trombina para segmentar el fibrinógeno y su contribución a episodios de polimerización de fibrina los que son críticos para mantener la estasis.

La iniciación del coágulo, a menudo denominada tiempo de coagulación, se produce en la intersección entre las fases de iniciación y propagación cuando sólo se ha formado aproximadamente 5% de trombina. La mayoría de la trombina formada se genera después de la iniciación de la polimerización de fibrina, así, la velocidad de polimerización de fibrina es un indicador más sensible de la dinámica de la coagulación. Los cambios en la fase de propagación, la fase de amplificación y las rutas anticoagulantes alteran la velocidad de generación de trombina y el impacto de la disponibilidad de trombina sobre la velocidad de polimerización de fibrina. Estudios recientes de Cawthern *et al.* (1998) sugerían que la medida de esta trombina es más informativa que el tiempo de coagulación al determinar la patofisiología de las hemofilias. Sin embargo, estos investigadores midieron la trombina observando la cinética de formación del complejo trombina-antitrombina (indicador de la generación de trombina) y la formación de fibrinopéptido A (indicador de la segmentación de fibrinógeno) y no al medir la cinética de polimerización de fibrina. Las variaciones en la concentración o la calidad de las hebras de fibrinógeno o fibrina solo pueden medirse como una función del proceso de polimerización real. Los ensayos usados actualmente para determinar variaciones en el proceso de coagulación típicamente solo pueden determinar variaciones en una o dos fases. Estos ensayos miden episodios independientemente y por lo tanto niegan o eliminan la capacidad para detectar variaciones en las otras fases o interacciones entre las diversas fases.

Ensayos asociados con la evaluación del riesgo de hemorragia incluyen los ensayos del tiempo de protrombina (PT), el tiempo parcial de tromboplastina activado (aPTT), el tiempo de trombina (TT) y el fibrinógeno (Fib) (figura 2). Estos ensayos se basan en la adición de potentes activadores del proceso de coagulación y así solo son anormales cuando están presentes defectos. Estos ensayos no están diseñados para detectar el efecto combinado de múltiples alteraciones menores. Por ejemplo, en la prueba del PT, que utiliza una concentración muy alta de un extracto tisular, llamado tromboplastina, se añade calcio a plasma con citrato. Sangre entera se mezcla con citrato cuando se toma la muestra de sangre. El citrato se une al calcio y “anticoagula” la sangre ya que se requieren iones calcio para el ensamblaje de los complejos de tenasa y protrombinasa. A continuación, la muestra de sangre se centrifuga y el plasma se separa. Cuando se añade calcio de nuevo, pueden formarse los complejos de tenasa (o Xasa) y protrombinasa y puede generarse trombina. La fuente de factor tisular es el la tromboplastina. Sin embargo, la concentración de factor tisular es extremadamente alta (suprafisiológica) y así solo se requiere la fase de iniciación de la generación de trombina. Las fases de propagación y amplificación se saltan. Por lo tanto, el tiempo de protrombina es insensible a muchos cambios en la ruta de coagulación y es incapaz de detectar hipercoagulabilidad. Se han formulado ensayos basados en tromboplastina diluida para ayudar en la diagnosis de pacientes con síndrome antifosfolípido (APS). En estos métodos, la tromboplastina junto con los fosfolípidos se diluyen para potenciar la sensibilidad del PT a la presencia de anticuerpos antifosfolípido. El tiempo de coagulación PT diluido se prolonga en el APS debido a la falta de disponibilidad de superficies fosfolípicas y por lo tanto el ensayo es dependiente de fosfolípidos en lugar de dependiente de TF.

Ensayos asociados con la evaluación de un estado hipercoagulable (figura 2) incluyen el complejo trombina-antitrombina (TAT), el fragmento de protrombina F1.2, PAI 1, APCr y dímero D. Estos ensayos están diseñados para medir un marcador o producto específico del proceso de coagulación. Por ejemplo, la medida de niveles elevados de dímero D indica que el proceso de coagulación se ha activado. Sin embargo, no hay modo de determinar si el dímero D estaba produciéndose como un producto del proceso de curación normal o si hay un riesgo hipercoagulable subyacen-

ES 2 363 210 T3

te. El estado hipercoagulable no puede evaluarse globalmente mediante un solo ensayo sino que actualmente requiere un conjunto de pruebas. Un ensayo global para la evaluación del potencial hemostático sería capaz de identificar un desequilibrio utilizando un solo principio que es sensible a defectos, singulares o en combinación. El ensayo también sería sensible a los efectos de la intervención para restaurar el equilibrio hemostático.

Reconociendo las limitaciones de los ensayos de rastreo disponibles para la evaluación hipocoagulable y el conjunto de ensayos requeridos para la evaluación hipercoagulable, otros han tratado de desarrollar pruebas globales. Estas pruebas se diseñan para ser sensibles a la cantidad de los componentes biológicos y sus interacciones, así como medir la dinámica de generación de trombina, incluyendo la regulación. La curva de generación de trombina fue descrita hace más de 30 años como una medida del potencial generador de trombina del plasma. Se ha descrito una modificación de la curva de generación de trombina con cuantificación de trombina con un sustrato cromogénico añadido exógenamente. Esto se ha denominado potencial de trombina endógena (ETP). El ensayo supone que hay una correlación directa entre el potencial de trombina endógena medido a través de un sustrato artificial añadido exógenamente y la determinación de un desequilibrio hemostático. El uso de un sustrato artificial en lugar del sustrato natural de trombina, el fibrinógeno, ignora los efectos de las variaciones en la concentración de fibrinógeno y la configuración del fibrinógeno. La trombina es un producto de segmentación de la proteólisis de protrombina, una serina proteasa. La trombina segmenta a continuación el fibrinógeno, su sustrato natural, dando como resultado monómeros de fibrina solubles que se reticulan a través de FXIIIa para formar coágulos polimerizados reticulados. La trombina es una molécula altamente regulada que posee comportamiento tanto procoagulante como antitrombótico. Adicionalmente, hay numerosos sustratos que desactivan la trombina antes de que pueda segmentar el fibrinógeno. Además de no medir directamente la capacidad para formar un coágulo, en ensayo de ETP tiene varias otras limitaciones principales. Limitaciones de la prueba incluyen:

- 1 La muestra de plasma debe desfibrinarse, típicamente con un veneno de serpiente. Los venenos de serpiente desfibrinantes activan FX y también segmentan el sustrato cromogénico usado para cuantificar la trombina. Esto puede provocar una sobreestimación variable del potencial de trombina.
- 2 La muestra de plasma se diluye considerablemente a fin de prolongar la dinámica de generación de trombina. Esto da como resultado una regulación no fisiológica de la explosión de trombina.
- 3 La técnica implica submuestreo múltiple en puntos temporales especificados. Por ejemplo, un dispositivo de pipeteo conectado a un ordenador diseñado a fin de terminar la actividad de trombina en las submuestras exactamente en un tiempo especificado. Es posible realizar el ensayo manualmente pero está más allá de la capacidad de muchos técnicos y requiere una experiencia considerable. La prueba no puede automatizarse en coagulómetros de laboratorio clínico estándar.
- 4 La formación del complejo trombina-macroglobulina ² conduce a una sobreestimación del potencial de trombina. Por lo tanto, se requiere una manipulación matemática compleja de los resultados para aproximarlos al potencial de trombina verdadero.
- 5 No tiene en cuenta la velocidad o la capacidad de la trombina para segmentar fibrinógeno.

Duchemin *et al.* describieron una modificación adicional del ETP en la que la ruta de proteína C se evalúa al añadir trombomodulina exógena. Este método también se modificó para tener en cuenta proteínas que modulan la actividad anticoagulante, incluyendo antitrombina III. Como el ETP, este ensayo modificado está diseñado sólo para medir la generación de trombina y no los efectos de la trombina, es decir, la formación dinámica de coágulos.

Otros investigadores han intentado diseñar ensayos sensibles al material compuesto de componentes biológicos del proceso de coagulación y sus interacciones. Uno de tales ejemplos es descrito por Kraus (solicitud canadiense 2.252.983). Sin embargo, el método se limita a determinar el potencial anticoagulante de una muestra al añadir trombomodulina y tromboplastina en una prueba de coagulación. En el método descrito se pone el énfasis en diluciones de tromboplastina tales que se produce trombina a una velocidad suficientemente lenta para permitir una activación suficiente de proteína C durante el tiempo de medida del aparato de coagulación. Una desventaja de este método es que, debido a que depende del tiempo de coagulación, la cantidad de tromboplastina es más restrictiva y se requieren concentraciones superiores para compensar incrementos en el tiempo de coagulación cuando se añade trombomodulina. Debido a que el método descrito se dirige a determinar el potencial anticoagulante y no el potencial hemostático global, el ensayo no es sensible a defectos en las fases de propagación y amplificación, la cinética de la polimerización del coágulo o a las interrelaciones entre los factores responsables de la generación de trombina.

Sin embargo, la presente invención evalúa el potencial tanto anticoagulante como procoagulante de una muestra de sangre. Además, la sensibilidad de la presente invención puede potenciarse al usar un activador de la coagulación más diluido, más diluido de lo que se ha usado previamente, ya que el método del punto final no está restringido al tiempo de coagulación sino que el análisis puede realizarse para todo el proceso de coagulación dinámico según se mide al evaluar parámetros cinéticos del perfil de datos ópticos. El análisis de algo más que simplemente el tiempo de coagulación puede efectuarse incluso cuando se forman coágulos muy débiles e inestables.

Las variaciones en las fases de amplificación y/o propagación reducirán o alterarán la velocidad de generación de trombina y así afectan a la velocidad de segmentación de fibrinógeno y finalmente a la velocidad de polimerización de fibrina. Debido a que la presente invención puede medir la velocidad de polimerización de fibrina a través del proceso de coagulación dinámico, mide la trombina clínicamente importante que se genera después del tiempo de coagulación.

Otra técnica anterior (Mann *et al.*) evalúa problemas de coagulación al tomar una serie de medidas independientes e indirectas. La generación de trombina se mide como una función de la formación del complejo TAT o el uso de un sustrato cromogénico en la formación de fibrina según se mide por la liberación de FPA. Todos los sistemas y modelos hasta la fecha se han diseñado para comprender un proceso o interacción discretos del proceso de coagulación y no pueden proporcionar una determinación del potencial hemostático global. En contraste, el método de la presente invención está diseñado no sólo para determinar la interacción de las proteínas de coagulación junto con superficies celulares sintéticas, se dirige a capturar esto en una medida dinámica que se correlaciona con los resultados clínicos. La tecnología y los métodos descritos en la presente invención también pueden modificarse para introducir componentes del sistema fibrinolítico así como células y condiciones de flujo.

Givens *et al.* demostraron que un modelo que caracteriza el proceso de formación de coágulos y utiliza parámetros además del tiempo de coagulación es sensible a defectos en las proteínas de coagulación. La Tabla 1 describe los parámetros definidos por Givens *et al.* y las Figuras 4 y 5 ilustran cómo se determinan esos parámetros y cómo se relacionan con la polimerización de fibrina para los ensayos de PT y APTT. Sin embargo, este trabajo se efectuó utilizando datos procedentes de los ensayos de PT y APTT, que, como se divulgaba previamente, solo son sensibles a episodios asociados con el estado hipocoagulable. Adicionalmente, el trabajo descrito se efectuó en presencia de una formación de coágulos resistentes debido a la adición de concentraciones supra fisiológicas de factor tisular. La polimerización de fibrina se altera significativamente en un sistema diluido diseñado para la determinación hemostática global, dando como resultado una formación de coágulos débiles e inestables. Se requieren una determinación hemostática global y nuevos métodos para verificar y cuantificar la polimerización de fibrina.

Sumario de la invención

A fin de vencer las deficiencias de la técnica anterior que se apuntan previamente, se han desarrollado ahora un reactivo y un estuche para una prueba global de coagulación que sea exacta y fácil de usar. Con la presente invención, puede usarse un solo ensayo para cuantificar tanto hiper- como hipocoagulabilidad. El concepto se basa en la adición de una concentración mínima de un activador de la coagulación de tromboplastina suficiente para accionar pero insuficiente para dar como resultado una polimerización completa de fibrina a fin de permitir la detección de perturbaciones en las rutas de propagación, amplificación y polimerización. La concentración del activador de la coagulación es 11 picomolar o menos. En un sistema diluido, la coagulabilidad (hiper/hipo) de una muestra determina la magnitud de la explosión de trombina y la influencia directa e indirecta que tiene sobre la velocidad de polimerización de fibrina. Este concepto es contrario a un sistema de ensayo tal como el PT, que usa cantidades en exceso de TF (o tromboplastina). Por lo tanto, en el método de la presente invención, las perturbaciones en los ciclos de propagación y amplificación son accesibles, mientras que en la prueba de PT tradicional estas partes de la ruta de coagulación son eclipsadas por las cantidades excesivas de Factor IIa producidas por la fase de iniciación.

En una realización de la invención, la velocidad de polimerización de fibrina producida por una dilución de activador de la coagulación estandarizada se usa a continuación para indicar si una muestra de plasma es normal, hiper- o hipocoagulable. Además, la técnica puede usarse para determinar cuánto necesita modificarse el plasma a fin de restaurar la coagulabilidad hasta la normal. Por ejemplo, en el caso de la hipocoagulabilidad, esto podría conseguirse mediante la sustitución del factor de coagulación o, en el caso de la hipercoagulabilidad, por la adición de un anticoagulante natural o el uso de un fármaco anticoagulante.

En la presente invención, a una dilución de activador de la coagulación dada, la velocidad de polimerización de fibrina de plasmas con hemofilia es menor que la velocidad de polimerización para un plasma normal y la velocidad de polimerización de fibrina de plasmas con trombofilia es mayor que la de una muestra normal. La velocidad de polimerización de fibrina es sensible a pequeños cambios en los componentes de la hemostasis aun cuando no puedan detectarse diferencias en el tiempo de coagulación. La Figura 6 ilustra formas de onda procedentes de los especímenes normales, hipercoagulables e hipocoagulables. La velocidad de polimerización se ve afectada aunque el tiempo de iniciación del coágulo esté esencialmente inalterado.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan un reactivo y un estuche que pueden usarse para determinar el grado de hiper- o hipocoagulabilidad de una muestra de plasma. Por otra parte, puede usarse sobre muestras que contienen plaquetas u otras células como una medida de la contribución de los componentes celulares a la coagulabilidad. La prueba, en algunas realizaciones, se basa en el uso de una dilución estandarizada de factor tisular en presencia de un exceso de fosfolípidos con la velocidad de formación de fibrina como el punto final de detección. La prueba es simple y puede automatizarse en coagulómetros de laboratorio estándar. La prueba de la presente invención pueden ponerse en marcha sobre una muestra de prueba en ausencia de la adición de un sustrato exógeno, p. ej. un sustrato cromogénico. La prueba es sensible a la concentración y/o la configuración de fibrina.

ES 2 363 210 T3

En una realización adicional de la invención, se adoptan modificaciones de los componentes o las concentraciones del reactivo o la selección del punto final para facilitar el desarrollo y/o la verificación de nuevos agentes farmacéuticos. Ejemplos de tales aplicaciones son inhibidores de la iniciación de la ruta de TF (TFPI, inhibidores de FVIIa), inhibidores de la generación de trombina tales como inhibidores de FXa, (pentasacáridos sintéticos) e inhibidores de la actividad de trombina (inhibidores directos de trombina). La composición, el tamaño o la concentración de lípidos también pueden modificarse para ajustar el ensayo hacia el desarrollo de fármacos orientados a las rutas de propagación y amplificación. Por ejemplo, la composición de lípidos puede alterarse para producir vesículas que maximizan la generación de Xa o, alternativamente, diseñarse para maximizar la actividad de protrombinasa. Así, puede evaluarse la eficacia de los inhibidores de Xa y los dirigidos al complejo de protrombinasa. La invención también puede modificarse para enfocarse al potencial anticoagulante del plasma al incluir trombomodulina, un activador de proteína C. También pueden añadirse al reactivo vesículas lipídicas que maximizan la actividad de APC. El ensayo también puede modificarse para exagerar una subpoblación medianamente anormal. Las consecuencias de este sistema son que las muestras gravemente trombóticas o hemorrágicas superarán la relación señal a ruido y no se medirán, pero se obtendrían diferencias sutiles al comienzo de una enfermedad o una indicación previa de intervención eficaz. La selección del punto final y las relaciones derivadas de la comparación con muestras conocidas se explotarían para mejorar adicionalmente la sensibilidad y la especificidad de las modificaciones de reactivos. Por lo tanto, estos sistemas se utilizarían en los procedimientos de descubrimiento de fármacos y desarrollo de fármacos en los que se requiere un ensayo diseñado para una valoración global del potencial hemostático.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra las consecuencias de cualquier perturbación en este denominado equilibrio o potencial hemostático.

Figura 2 ilustra las condiciones asociadas con la existencia de hemostasis y lista ejemplos de ensayos usados para evaluar el grado o la presencia de un desequilibrio.

La Figura 3 ilustra las cuatro fases dependientes del proceso de coagulación.

La Figura 4 ilustra los datos ópticos de un ensayo de coagulación y la primera y segunda derivada calculada a partir de esos datos.

La Figura 5 ilustra donde están situados $mín_2$, el índice temporal del $mín_2$ (tiempo de coagulación), $mín_1$, $máx_2$ y delta (proporcional a la concentración de fibrinógeno) en el perfil de datos ópticos.

La Figura 6 ilustra ejemplos de formas de onda para el ensayo de rastreo global con factor tisular diluido.

La Figura 7 ilustra el cambio en la relación como una función de la dilución para un espécimen deficiente en FVIII y un espécimen deficiente en proteína S.

La Figura 8 ilustra relaciones de los valores $mín_1$ (la velocidad máxima de polimerización de fibrina) para especímenes hipocoagulables a tres diluciones de rTF en comparación con los valores $mín_1$ de la relación de la misma dilución de un plasma normal.

La Figura 9 ilustra relaciones de los valores $mín_1$ para especímenes hipercoagulables a tres diluciones de rTF y trombomodulina 10 nM en comparación con valores $mín_1$ de la relación para las mismas condiciones de un plasma normal.

La Figura 10 ilustra los efectos sobre los valores $mín_1$ de concentraciones variables de factor tisular y trombomodulina en los resultados para plasmas hipercoagulables, hipocoagulables y normales.

Las abreviaturas en las figuras son como sigue:

- Factor Activado IX (FIXa)
- Factor Activado V (FVva)
- Factor Activado VII (FVIIa)
- Factor Activado VIII (FVIIIa)
- Factor Activado X (FXa)
- Factor Activado XI (FXIa)
- Factor Activado XIII (FXIIIa)

ES 2 363 210 T3

- Proteína C Activada (APC)
- Factor II (FII)
- 5 Factor IX (FIX o F9)
- Factor V (FV)
- Factor V Leiden (FVL)
- 10 Factor VII (FVII)
- Factor VIII (FVIII o F8)
- 15 Deficiente en Factor VIII (FVIII-def)
- Factor X (FX)
- Factor XI (FXI)
- 20 Factor XIII (FXIII)
- George King (GK)
- 25 HRF (Hemophilia Research Foundation)
- Organon Teknika Normal Pool Plasma (OT NPP)
- Proteína C (PC)
- 30 Deficiente en Proteína C (PC Def.)
- Proteína S (PS)
- 35 Deficiente en Proteína S (PS-Def)
- Mutación de Protrombina 20210 (PT 20210)
- Factor Tisular Recombinante (rTF)
- 40 Trombina o Factor II Activado (FIIa)
- Trombomodulina (TM)
- 45 Factor Tisular (TF)
- Factor de Von Willebrand (vWF).

50 Descripción detallada de la realización preferida

La presente invención se dirige a un reactivo y un estuche para determinar si un paciente o espécimen procedente de dicho paciente es hipercoagulable, hipocoagulable o normal en una sola prueba según se define en las reivindicaciones. La prueba comprende las etapas de iniciar la coagulación en una muestra de paciente *in vitro* en presencia de un activador. Dicho activador se añade a la muestra en una cantidad que dará como resultado polimerización de fibrina dependiente de tenasa intrínseca (implica ciclos de propagación y amplificación). El activador de la coagulación es una tromboplastina en una concentración de 11 picomolar o menos. Preferiblemente, la muestra de plasma no está diluida, permitiendo así concentraciones suficientes de todas las proteasas e inhibidores endógenos. La formación de la polimerización de fibrina se registra a lo largo del tiempo a fin de derivar un perfil gráfico de polimerización dependiente del tiempo. Este perfil mostrará si el paciente es hipercoagulable, normal o hipocoagulable al comparar el perfil de la muestra con un perfil procedente de una muestra conocida.

El activador es una tromboplastina, preferiblemente factor tisular (TF). En su forma más preferida, el TF es TF recombinante (rTF) que se relipida con fosfolípidos, que forman vesículas liposomales. Preferiblemente, los fosfolípidos proporcionan las superficies para ensamblar complejos de Xasa intrínseca y protrombinasa. Los fosfolípidos están presentes en una concentración que no es limitativa de la velocidad con respecto al proceso de coagulación y permanece constante e independiente de la dilución. Estas vesículas fosfolípicas o liposomas imitan las superficies de las plaquetas y los monocitos.

ES 2 363 210 T3

Se generan perfiles de datos ópticos en un analizador de la coagulación automatizado tal como el MDA™180 ofrecido por Organon Teknika Corporation. Preferiblemente, los puntos finales, tales como el tiempo de iniciación del coágulo y la velocidad de polimerización, se calculan a partir de los perfiles de datos. Más preferiblemente, se calculan las derivadas 1ª y 2ª a partir del perfil de datos y se calculan el mín y el máx de la derivadas con respecto al valor y el índice temporal asociado. Lo más preferiblemente, se calculan los puntos finales y se calculan una o más de las siguientes reacciones usando los puntos finales mencionados:

- 5 Opción 1 - Punto o puntos finales
- 10 Opción 2 - Relación a diferentes diluciones (relación 1)
Punto final (z) para la dilución (x)
15 Punto final (z) para la dilución (y)
- Opción 3 - Relación de diluciones en comparación con normal (relación 2)
20 Relación 1 para muestra de paciente
Relación 1 para plasma normal
- 25 Opción 4 - Relación para diferentes formulaciones de reactivos
Relación 2 con la formulación (a)
Relación 2 con la formulación (b)
- 30 Opción 5 - Relación of diferentes puntos finales
Relación 2 con punto final (z)
35 Relación 2 con punto final (z')
- Opción 6 - Relación de espécimen a normal a una dilución dada
40 Punto final (z) a una dilución x para un espécimen
Punto final (z) a una dilución x para un plasma normal

45 Adicionalmente, pueden calcularse otras relaciones, diferencias o modelos para normalizar el ensayo. El plasma normal puede sustituirse por cualquier plasma conocido. Plasma conocido se define como un plasma que se ha caracterizado con respecto a una condición del espécimen.

50 La Figura 1 ilustra las consecuencias de cualquier perturbación en este denominado equilibrio o potencial hemostático. Demasiado poca hemostasis (función plaquetaria disminuida, hipocoagulación, hiperfibrinólisis) en la zona de lesión conduce a hemorragia persistente, mientras que demasiada hemostasis (función plaquetaria incrementada, hipercoagulación, hipofibrinólisis) conduce a la formación de un trombo excesivo con obstrucción vascular e isquemia.

55 La Figura 2 ilustra las condiciones asociadas con la existencia de hemostasis y lista ejemplos de ensayos para valorar el grado o la presencia de un desequilibrio.

60 La Figura 3 ilustra las cuatro fases del proceso de coagulación, (1) la fase de iniciación, (2) la fase de amplificación, (3) la fase de propagación y (4) la fase de polimerización de la hemostasis. Todas las fases se ven afectadas por procesos de regulación y retroalimentación denominados rutas anticoagulantes.

65 La Figura 4 ilustra los datos ópticos procedentes de un ensayo de coagulación y la primera y segunda derivada calculada a partir de los datos. La Tabla 1 describe un grupo de parámetros calculados a partir de los datos y las derivadas ilustrados en la figura 4.

ES 2 363 210 T3

TABLA 1

5
10
15
20
25
30

Parámetro	Descripción
Pendiente 1	Pendiente inicial del punto A al punto B
Delta 1	Amplitud de cambio de señal del punto A al punto B
Pendiente 3	Pendiente final del punto D al punto E 25
Delta	Amplitud de cambio de señal
Índice Mín 1	Tiempo en el punto C
Mín 1	Valor mínimo de la 1ª derivada (Velocidad de cambio en el punto C)
Índice Máx 2	Tiempo en el punto D
Máx 2	Valor máx. de la 2ª derivada 30 (Aceleración en el punto D)
Índice Mín 2	Tiempo en el punto B
Mín 2	Valor mínimo de la 2ª derivada (Aceleración en el punto B)

35 La Figura 5 ilustra donde están situados mín_2, el índice temporal de mín2 (tiempo de coagulación), mín_1, máx_2 y delta (proporcional a la concentración de fibrinógeno) en el perfil de datos ópticos.

40 La Figura 6 contiene ejemplos de formas de onda para el ensayo de rastreo global con factor tisular diluido. El espécimen hipercoagulable resistente a APC genera una forma de onda que tiene esencialmente el mismo tiempo de iniciación del coágulo en comparación con el normal. Sin embargo, la velocidad de polimerización de fibrina para el espécimen hipercoagulable es significativamente mayor que la del normal. Los especímenes hipocoagulables deficientes en FVIII y FIX tienen solo un tiempo ligeramente prolongado de iniciación del coágulo mientras que las velocidades de polimerización son significativamente reducidas cuando se comparan con especímenes normales o hipercoagulables.

45 La Figura 7 ilustra el cambio en la relación como una función de la dilución para un espécimen deficiente en FVIII y un espécimen deficiente en proteína S. Los valores de relación con un dilución 1:50.000 de tromboplastina se desvían de la respuesta del plasma normal. El espécimen hipocoagulable produce relaciones que son mayores que 1 y el espécimen hipercoagulable tiene relaciones que son menores que 1 para esta combinación de punto final (tiempo de coagulación)/relación. Adicionalmente, el espécimen anormal se desvía del normal a diferentes diluciones y en direcciones opuestas.

50 La Figura 8 contiene relaciones de los valores mín_1 (la velocidad máxima de polimerización de fibrina) para especímenes hipocoagulables con tres diluciones de rTF en comparación con los valores mín_1 de la misma dilución de un plasma normal. Todas las relaciones de los plasmas hipocoagulables para las tres diluciones son menores que la respuesta normal (valores de <1). A medida que la dilución se incrementa, es decir se proporciona menos factor tisular, se incrementa la diferencia en las relaciones.

55 La Figura 9 ilustra relaciones de los valores mín_1 para especímenes hipercoagulables con tres diluciones de rTF y trombomodulina 10 nM en comparación con los valores mín_1 de la relación para las mismas condiciones de un plasma normal. Todas las relaciones de los plasmas hipercoagulables para las tres diluciones son mayores que la respuesta normal (valores de >1). A medida que la dilución se incrementa, es decir se proporciona menos factor tisular, se incrementa la diferencia en las relaciones.

60 La Figura 10 ilustra los efectos sobre los valores mín_1 de concentraciones variables de factor tisular y trombomodulina sobre los resultados para plasmas hipercoagulables, hipocoagulables y normales. Los datos indican que puede definirse una concentración óptima para facilitar la diferenciación entre plasmas normales, hipercoagulables e hipocoagulables. Adicionalmente, otras concentraciones de factor tisular y trombomodulina facilitan mejoras en la

ES 2 363 210 T3

sensibilidad y la especificidad para una condición particular a costa de la sensibilidad y la especificidad para otro tipo de condición.

Las Tablas 2 y 3 resumen los resultados de medir los parámetros cinéticos mín 1 y mín 2 con una serie de plasmas de pacientes definidos. La concentración de TF era 10 pM y la TM se ajustó hasta 10 nM. La concentración de fosfolípidos se mantenía constante a 150 micromolar. Los datos muestran que el reactivo en presencia de TM es capaz de diferenciar plasmas hiper e hipocoagulables con una sola formulación de reactivos. Adicionalmente, los datos indican que la TM no es esencial para obtener una discriminación entre la hipocoagulable y una fracción reunida de plasma estándar normal. Los datos se calculan como relaciones con una fracción reunida normal con y sin trombomodulina. Las relaciones del parámetro mín2 eran superiores que los valores mín 1 correspondientes para los plasmas hipercoagulables.

Las Tablas 2 y 3 ilustran el comportamiento de plasmas definidos en presencia y ausencia de trombomodulina según se determina por los puntos finales cinéticos mín_1 y mín_2.

TABLA 2

Tipo de Plasma	Valores mín_1 sin TM	Valores mín_1 con TM 10 nM	Relación Mín_1 Especimen sin TM 10 nM/Plasma normal sin TM 10 nM	Relación Mín_1 Especimen con TM 10 nM/Plasma normal con TM 10 nM
Plasma Normal	101	68		
Deficiente en PC	110	105	1,09	1,54
Lupus	116	79	1,15	1,16
FV Leiden	95	77	0,94	1,13
FV Leiden y PT 20210	260	248	2,57	3,64
Deficiente en FIX	71	40	0,70	0,59
Deficiente en FVIII	84	46	0,83	0,68

ES 2 363 210 T3

TABLA 3

Tipo de Plasma	Valores mín_2 sin TM	Valores mín_2 con TM 10 nM	Relación Mín_2 Especimen sin TM 10 nM/Plasma normal sin TM 10 nM	Relación Mín_2 Especimen con TM 10 nM/Plasma normal con TM 10 nM
Normal Plasma	34,8	11,9		
Deficiente en PC	36,4	27,6	1,05	2,32
Lupus	47,4	23,6	1,36	1,98
FV Leiden	32,6	20,3	0,94	1,71
FV Leiden y PT 20210	181	165	5,2	13,9
Deficiente en FIX	21	9	0,60	0,76
Deficiente en FVIII	16,4	6,4	0,47	0,54

Ejemplo 1

El ensayo se efectuó al añadir 50 μ l de plasma a 50 μ l del activador y a continuación añadir 50 μ l del reactivo de partida. Una muestra normal, una muestra hipocoagulable (plasma deficiente en Factor VIII) y un plasma hipercoagulable (plasma deficiente en proteína S) se evaluaron a diversas diluciones del activador. El activador era una tromboplastina disponible comercialmente (Thromborel R, Behring Diagnostics) diluida con un tampón con dos diluciones, una 1:100 y 1:50000 de su concentración original. El reactivo de partida consistía en cloruro cálcico 0,25 M. El ensayo se efectuó a 37°C y la reacción se verificó a 580 nm durante 300 segundos. Los puntos finales se calcularon para los índices de tiempo y velocidad de formación del coágulo. Las relaciones de los puntos finales se compararon con otras diluciones y otras muestras como sigue:

Donde x es una dilución 1:100 e y es una serie de diluciones

A medida que la dilución del reactivo se hace mayor (y se hace más alta) los resultados para los dos plasmas anormales (los plasmas hipercoagulable e hipocoagulable mencionados anteriormente) probados empiezan a desviarse de los puntos finales o las relaciones calculados del plasma normal. Los resultados pueden expresarse como la magnitud de desviación a una dilución dada o como la dilución requerida para desviarse del ideal (valor normal o intervalo normal). La Figura 7 ilustra que los resultados hipercoagulables e hipocoagulables se desvían en direcciones opuestas indicando la capacidad para diferenciar entre las dos condiciones.

Ejemplo II

El ensayo se efectuó al añadir 50 μ l de plasma a 50 μ l del activador y a continuación añadir 50 μ l del reactivo de partida. Un grupo de muestras normales, una serie de muestras procedentes de individuos hipocoagulables y una serie de plasmas procedentes de individuos hipercoagulables se evaluaron a diversas diluciones del activador. El activador era una preparación de TF reconstituida con fosfolípidos hasta entre 20 y 3,3 pM (dilución 1:20.000 a 1:120.000) y fosfolípido preparado mediante extrusión con y sin TM. El reactivo de partida consistía en cloruro cálcico 0,025 M. El ensayo se efectuó a 37°C y la reacción se verificó a 580 nm durante 300 segundos. El valor del mínimo de la 1a derivada y el valor del mínimo de la 2a derivada se calcularon para todas las muestras. Las relaciones de los puntos finales se compararon con otras diluciones y otras muestras como sigue:

Opción 1 - Punto o puntos finales

ES 2 363 210 T3

- Opción 2 - Relación a diferentes diluciones (relación 1)
Punto final (z) para la dilución (x)
5 Punto final (z) para la dilución (y)
- Opción 3 - Relación de diluciones en comparación con la normal (relación 2)
10 Relación 1 para muestra de paciente
Ratio 1 para plasma normal
- Opción 4 - Relación para diferentes formulaciones de reactivos
15 Relación 2 con la formulación (a)
Relación 2 con la formulación (b)
20
- Opción 5 - Relación de espécimen a normal a una dilución dada
Punto final (z) a una dilución x para un espécimen
25 Punto final (z) a una dilución x para un plasma normal

30 Las Figuras 8 y 9 ilustran la diferenciación para especímenes hipocoagulables e hipercoagulables cuando se comparan con el normal. Las Tablas 2 y 3 ilustran el comportamiento de plasmas definidos en presencia y ausencia de trombomodulina según se determina por los puntos finales cinéticos mín_1 y mín_2. La Figura 10 demuestra el efecto de variar el factor tisular y la trombomodulina sobre los resultados de plasmas hipocoagulables, hipercoagulables y normales. Los datos indican que las variaciones en las concentraciones facilitan mejoras en la sensibilidad y la especificidad para una condición a costa de la sensibilidad y la especificidad de otro tipo de condición.

35 En una realización preferida, el TF se añade a la muestra a una concentración de aproximadamente menor que o igual a 10 picomolar y la concentración de fosfolípido de entre 10 y 300 μM . El TF puede añadirse a la muestra a una concentración de 3 a 10 picomolar y las vesículas de fosfolípido pueden añadirse a 100 a 150 micromolar. Preferiblemente, se añade trombomodulina a 0 a 30 nanomolar y lo más preferiblemente a una concentración de 5 a 15 nanomolar. El cloruro cálcico se añade lo más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 25 mM. Todas las concentraciones de componentes reactivos se diluyen adicionalmente 1:3 en la matriz de plasma/tampón de la cubeta.

45 Una o más partes o puntos finales del perfil de medida dependiente del tiempo obtenido al verificar la polimerización de fibrina en la muestra de ensayo pueden compararse con las mismas partes o puntos finales de un perfil de medida dependiente del tiempo al verificar la polimerización de fibrina en la muestra de prueba a una concentración de activador de la coagulación diferente y/o con las mismas partes o puntos finales para una muestra de ensayo conocida (p. ej. normal). La parte del perfil puede ser uno o más de la iniciación de la formación del coágulo, el cambio global en el perfil, la pendiente del perfil después de la iniciación de la formación del coágulo y la aceleración en el momento de la iniciación del coágulo. Además, si se obtienen al menos dos perfiles de polimerización de fibrina dependientes del tiempo, puede obtenerse un perfil adicional para una muestra conocida procedente de una memoria informática o al añadir el activador a al menos una concentración a una muestra conocida y verificar la formación de polimerización de fibrina a lo largo del tiempo. Puede determinarse el parámetro procedente de cada perfil de polimerización de fibrina que tiene concentraciones variables de activador y puede determinarse una concentración a la que al menos un parámetro de dicha muestra que se prueba se desvía de lo normal. El punto de desviación es indicativo del estado hipercoagulable o hipocoagulable. La parte del perfil es preferiblemente un índice temporal del mínimo de la primera derivada, el valor del mínimo de la primera derivada, el índice temporal para el mínimo de la segunda derivada, el valor para el mínimo de la segunda derivada, el índice temporal del máximo de la segunda derivada, el valor del máximo de la segunda derivada, o la magnitud global del cambio. Más preferiblemente, la parte es la velocidad o la aceleración de polimerización de fibrina, en donde la velocidad o la aceleración se compara con la velocidad o la aceleración a la misma concentración de activador para la muestra conocida.

60 Aunque los puntos finales pueden compararse directamente según se apunta anteriormente, puede determinarse en su lugar una diferencia o relación de dichos parámetros para dicha muestra de prueba y dicha muestra normal. Si el parámetro es el tiempo de coagulación, puede determinarse una relación de tiempos de coagulación a diferentes concentraciones de activador. También puede determinarse una relación de otros parámetros, la velocidad de formación del coágulo, la aceleración máxima de formación del coágulo, la turbidez a un período de tiempo predeterminado y el cambio total en la turbidez, a fin de medir defectos en las fases de propagación y/o amplificación de trombina. Además,

ES 2 363 210 T3

puede tomarse una relación del al menos un parámetro para dicha muestra de prueba con el mismo parámetro para una muestra normal. Y la relación puede determinarse para múltiples concentraciones de activador para caracterizar mejor la hipo- o hiper-coagulabilidad. Por ejemplo, la concentración a la que dicha relación (muestra de prueba/muestra conocida) se aparta de 1 (o un intervalo de alrededor de 1) puede mostrar la coagulabilidad anormal.

5

Otras relaciones ayudan a la determinación del potencial hemostático (p. ej. la hipocoagulabilidad, estasis o hipercoagulabilidad; o la tendencia hemorrágica o trombótica del paciente). Por ejemplo, puede calcularse una primera relación para el al menos un parámetro a dos concentraciones diferentes del activador. Puede calcularse una segunda relación de dicha primera relación a dos concentraciones de activador diferentes con una primera relación calculada para una muestra conocida a dos concentraciones de activador diferentes. Puede calcularse una tercera relación de la segunda relación a una primera formulación de reactivos y la segunda relación a una segunda formulación de reactivos. Aunque el segundo reactivo puede variar de un número de modos del primero, en una realización la primera formulación de reactivo puede comprender un activador de la coagulación y la segunda formulación de reactivo puede comprender un activador de la coagulación y un activador de una ruta anticoagulante. Podría calcularse una cuarta relación de la segunda relación para un punto final relativa a la segunda relación calculada para un punto final diferente. Puede obtenerse información significativa al cambiar la formulación del reactivo y comparar los mismos puntos finales, o al mantener la formulación de reactivo (aunque posiblemente a una concentración diferente) y comparar diferentes puntos finales (o pueden alterarse tanto el punto final como la formulación y/o concentración del reactivo).

10

15

20

Un activador de una o más rutas anticoagulantes puede añadirse junto con el activador de la coagulación. Tal activador adicional puede ser cualquier activador de una ruta anticoagulante, tal como la ruta de la proteína C. La trombomodulina es un ejemplo, que puede añadirse en la forma de trombomodulina humana purificada, trombomodulina de mamífero no humano purificada, trombomodulina soluble o asociada a la membrana, trombomodulina natural o reconstituida con fosfolípidos, trombomodulina parcialmente o totalmente glicosilada o trombomodulina completamente desglucosilada, con moléculas similares a heparina añadidas. El activador de la coagulación puede ser cualquier activador adecuado incluyendo factor tisular recombinante o purificado, factor tisular truncado, o células que expresan factor tisular sobre su superficie. Si se añaden vesículas o liposomas, pueden estar en forma de plaquetas, residuo celular, fosfolípidos o micropartículas plaquetarias. Una sal metálica, si se añade, puede ser un haluro de magnesio, calcio o manganeso, u otra sal metálica divalente. Si se desea, también podrían añadirse tampones y estabilizantes.

25

30

Un reactivo o estuche para evaluar el potencial hemostático debe tener un activador de la coagulación. Componentes adicionales del reactivo o estuche podrían incluir las vesículas, sales metálicas o iones mencionados anteriormente, y un activador de la ruta anticoagulante, si se desea. En el estuche, los componentes podrían proporcionarse todos en recipientes separados, o mezclarse entre sí en cualesquiera combinaciones en uno o más recipientes. Si se añaden vesículas fosfolipídicas, pueden ser cualquier fosfolípido o combinación de fosfolípidos adecuados, incluyendo uno o más de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, que pueden proporcionarse en una relación de aproximadamente 5 a 30 por ciento en moles de fosfatidiletanolamina, 1 a 10 por ciento de fosfatidilserina y el resto fosfatidilcolina. Estas vesículas pueden prepararse en una variedad de modos para dar liposomas de diversos tamaños. Los fosfolípidos pueden proporcionarse en una concentración que no es limitativa de la velocidad, p. ej. a una concentración de 10 a 300 micromolar, y preferiblemente en el intervalo de 50 a 200 micromolar. El factor tisular puede proporcionarse a una concentración de 10 picomolar o menos, 8 picomolar o menos, o preferiblemente 6 picomolar o menos. La concentración podría ser 3 picomolar o menos, aunque, cualquiera que sea la concentración de factor tisular, debe permitir la evaluación del potencial hemostático según se indica en la presente memoria. Si se desea añadir trombomodulina, puede proporcionarse en una concentración de 30 nanomolar o menos, preferiblemente en un intervalo de 5 a 20 nanomolar. Si ha de añadirse una sal metálica, pueden proporcionarse en un reactivo o estuche a una concentración de 5 a 50 mM, preferiblemente de 15 a 35 mM. Son posibles variaciones en el método, el estuche y el reactivo descritos anteriormente, y las realizaciones divulgadas en la presente memoria deben considerarse ilustrativas y no limitativas.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 363 210 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Reactivo que comprende un activador de la coagulación capaz de permitir la evaluación del potencial hemostático de una muestra de sangre o plasma, en el que el activador de la coagulación es una tromboplastina y en el que la concentración del activador de la coagulación es 11 picomolar o menos.
2. Reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la tromboplastina es factor tisular.
- 10 3. Reactivo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el factor tisular comprende factor tisular recombinante o purificado, factor tisular truncado o células que expresan factor tisular sobre su superficie.
4. Reactivo de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el factor tisular está presente en una concentración de 6 picomolar o menos.
- 15 5. Reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el reactivo comprende además vesículas o liposomas y un catión metálico o una sal metálica, que se disocia en un catión metálico.
- 20 6. Reactivo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el catión metálico es un catión metálico divalente seleccionado de magnesio, calcio o manganeso.
7. Reactivo de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que las vesículas comprenden fosfolípidos.
- 25 8. Reactivo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que los fosfolípidos comprenden fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina o mezclas de las mismas.
9. Reactivo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la mezcla de fosfolípidos comprende la totalidad de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina y en una relación de aproximadamente 1 a 10 por ciento en moles de fosfatidilserina y de aproximadamente 5 a 30 por ciento en moles de fosfatidiletanolamina y el resto fosfatidilcolina.
- 30 10. Reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el reactivo comprende además un activador de una ruta anticoagulante.
- 35 11. Reactivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el activador de la ruta anticoagulante es un activador de proteína C.
- 40 12. Reactivo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el activador de proteína C es trombomodulina humana purificada, trombomodulina de mamífero no humano purificada, trombomodulina soluble o asociada a la membrana, trombomodulina natural o trombomodulina reconstituida con fosfolípidos, trombomodulina parcialmente glicosilada, trombomodulina completamente glicosilada o trombomodulina completamente desglicosilada.
- 45 13. Reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el reactivo comprende además tampones y/o estabilizantes.
- 50 14. Reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el reactivo es capaz de indicar que un paciente, del que se toma la muestra, tiene cualquier tendencia trombótica, tendencia hemorrágica o coagulabilidad normal, dependiendo del paciente.
- 55 15. Estuche para evaluar el potencial hemostático de una muestra de prueba que comprende un activador de la coagulación, que es una tromboplastina, en una concentración de 11 picomolar o menos;
- vesículas; y
- un catión metálico divalente o una sal metálica capaz de disociarse en un catión metálico divalente.
- 60 16. Estuche de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la tromboplastina es factor tisular.
17. Estuche de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el factor tisular comprende factor tisular recombinante o purificado, factor tisular truncado o células que expresan factor tisular sobre su superficie.
- 65 18. Estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en donde el estuche comprende además un activador de una ruta anticoagulante.
19. Estuche de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el activador de la ruta anticoagulante es un activador de proteína C.

ES 2 363 210 T3

20. Estuche de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el activador de proteína C es trombomodulina humana purificada, trombomodulina de mamífero no humano purificada, trombomodulina soluble o asociada a la membrana, trombomodulina natural o trombomodulina reconstituida con fosfolípidos, trombomodulina parcialmente glicosilada, trombomodulina completamente glicosilada o trombomodulina completamente desglucosilada.

5

21. Estuche de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la trombomodulina se relipida con fosfolípidos que comprenden al menos 10% de fosfatidiletanolamina.

22. Estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-21, en donde el estuche comprende además fosfolípidos en una concentración de 10 a 300 micromolar.

10

23. Estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-22, en el que las vesículas comprenden plaquetas, residuo celular, vesículas fosfolipídicas o micropartículas plaquetarias.

24. Uso de un reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en un solo ensayo para determinar una condición hipercoagulable, de coagulabilidad normal o hipocoagulable.

15

25. Uso de un estuche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-23 en un solo ensayo para determinar una condición hipercoagulable, de coagulabilidad normal o hipocoagulable.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

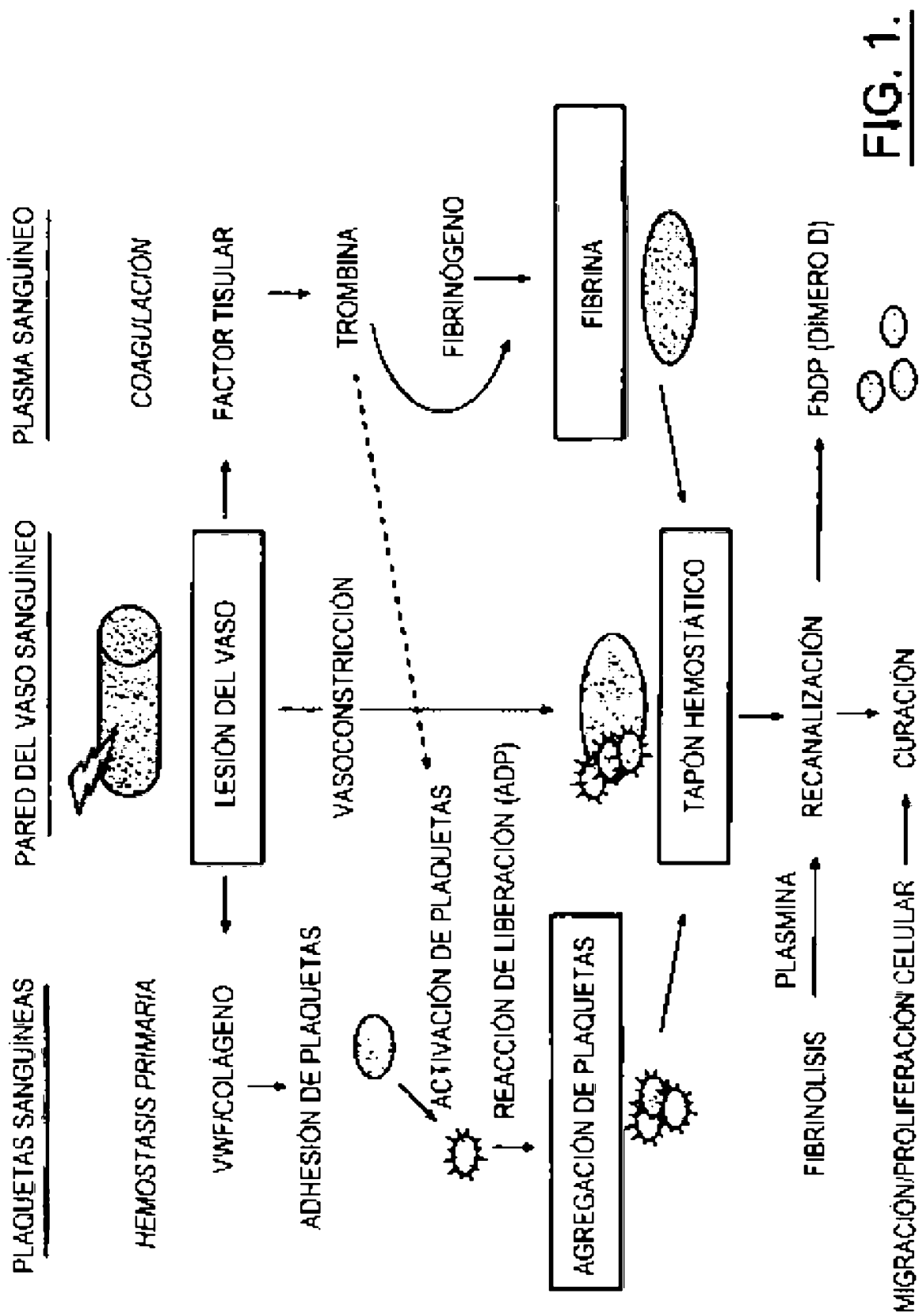
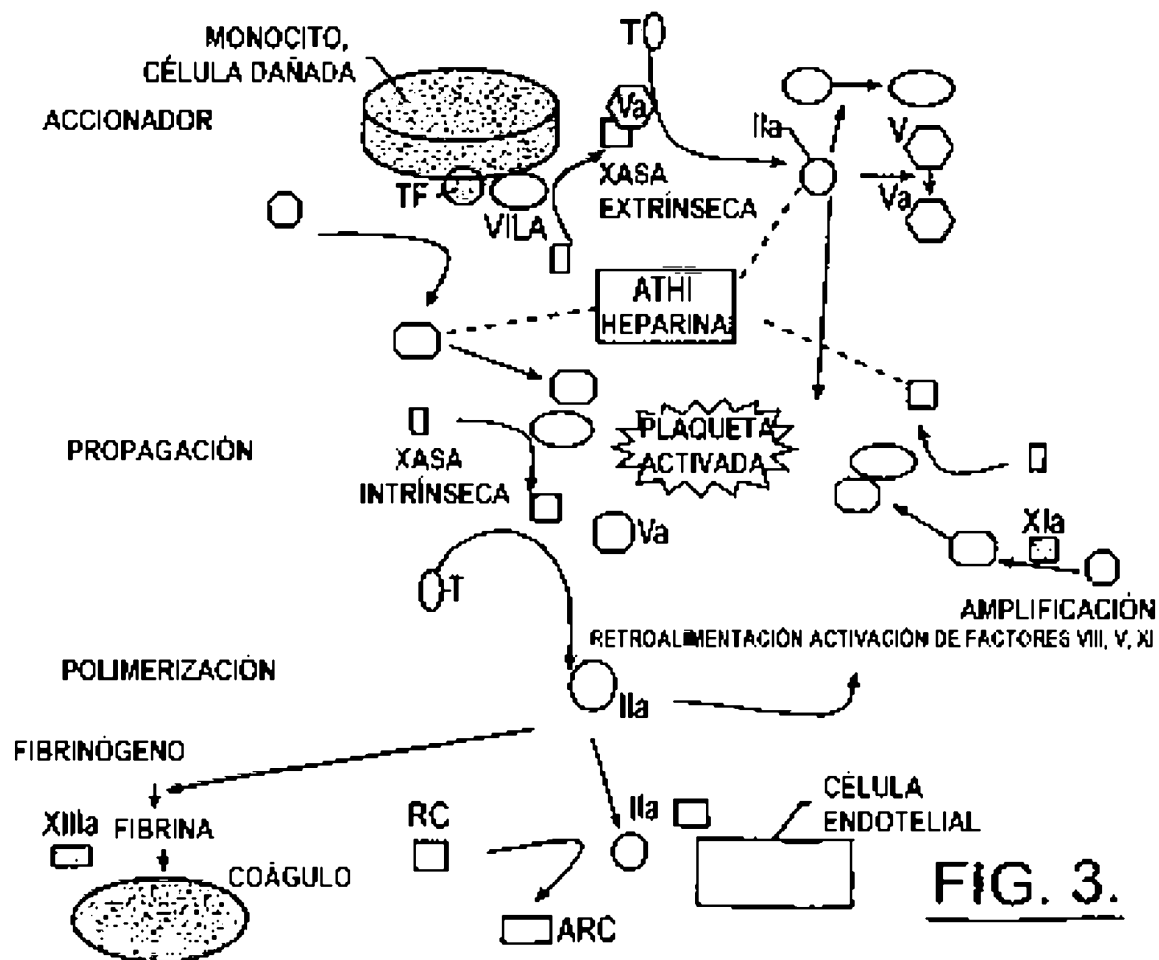
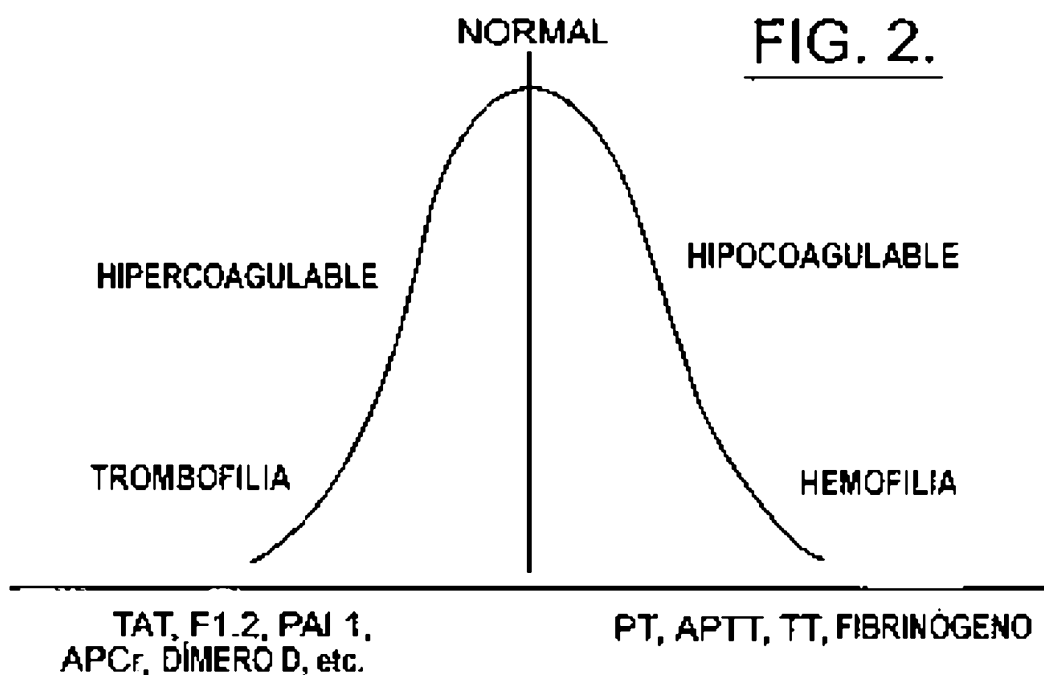


FIG. 1.



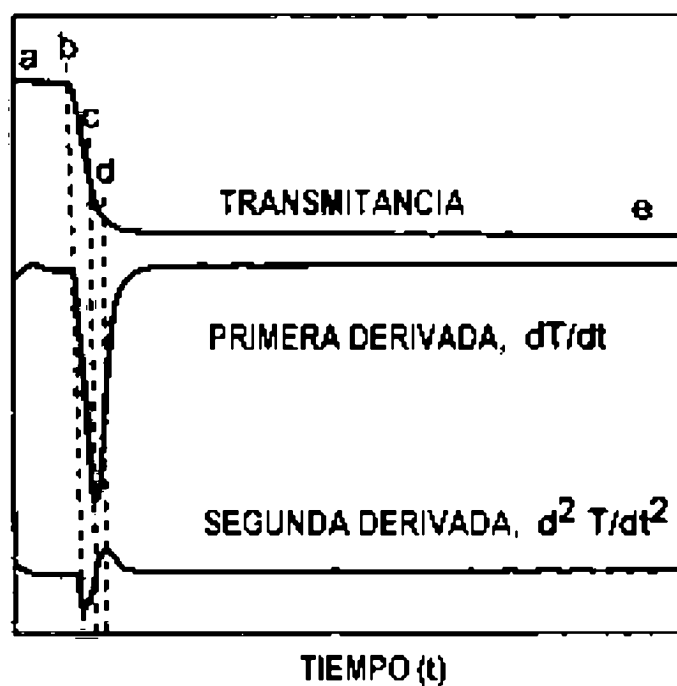


FIG. 4.

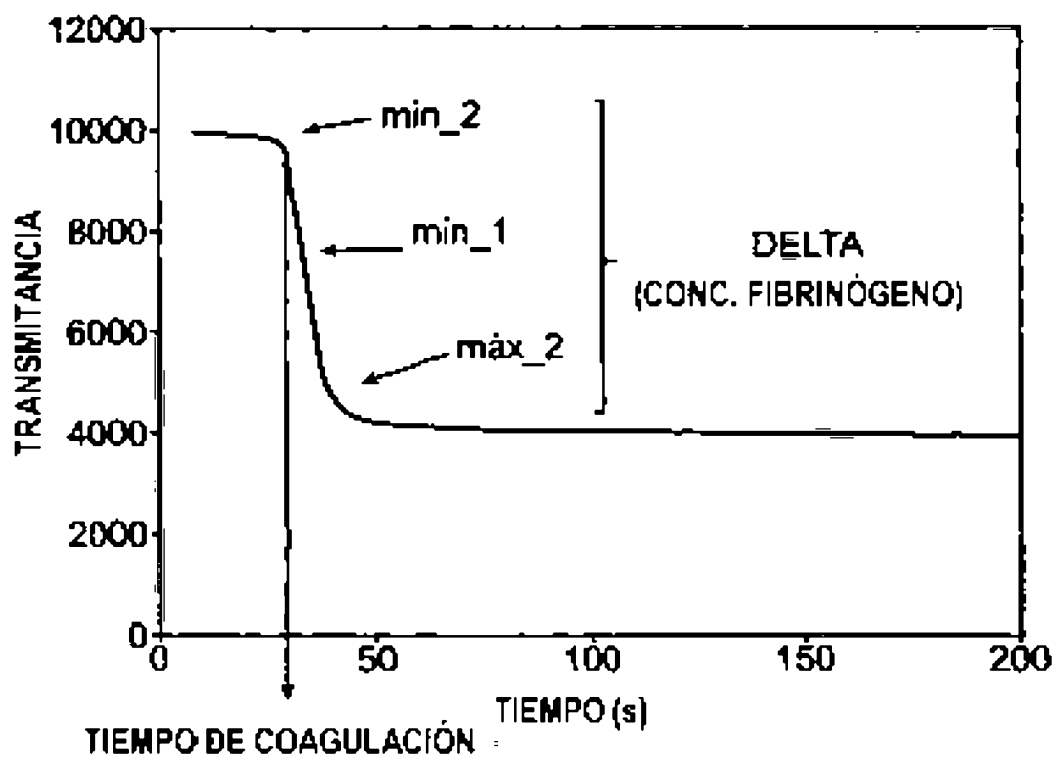


FIG. 5.

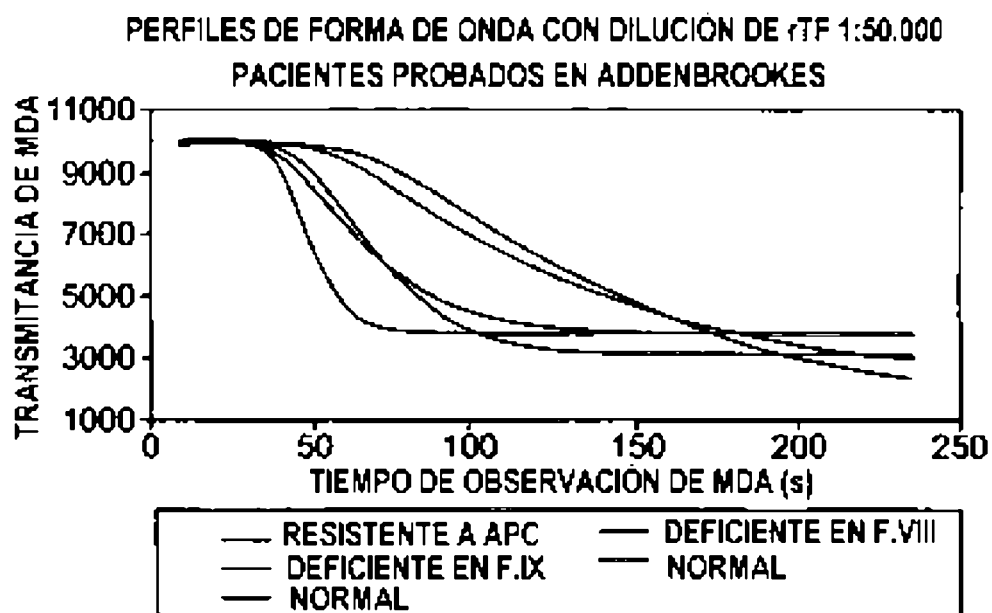


FIG. 6.

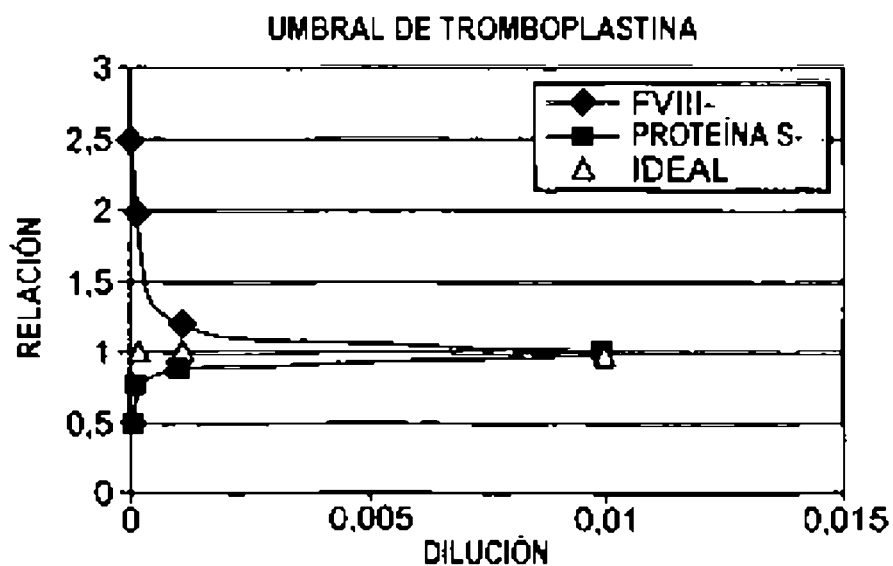


FIG. 7.

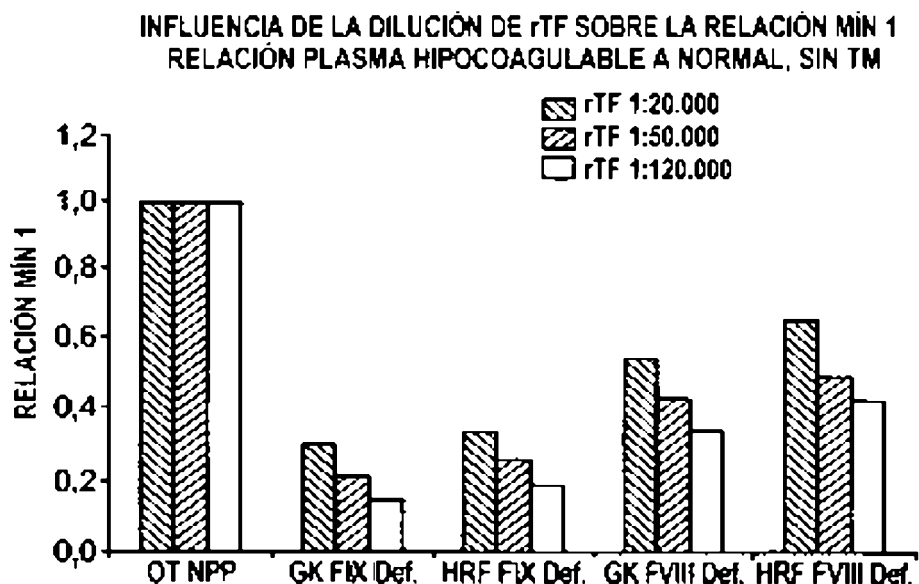


FIG. 8.

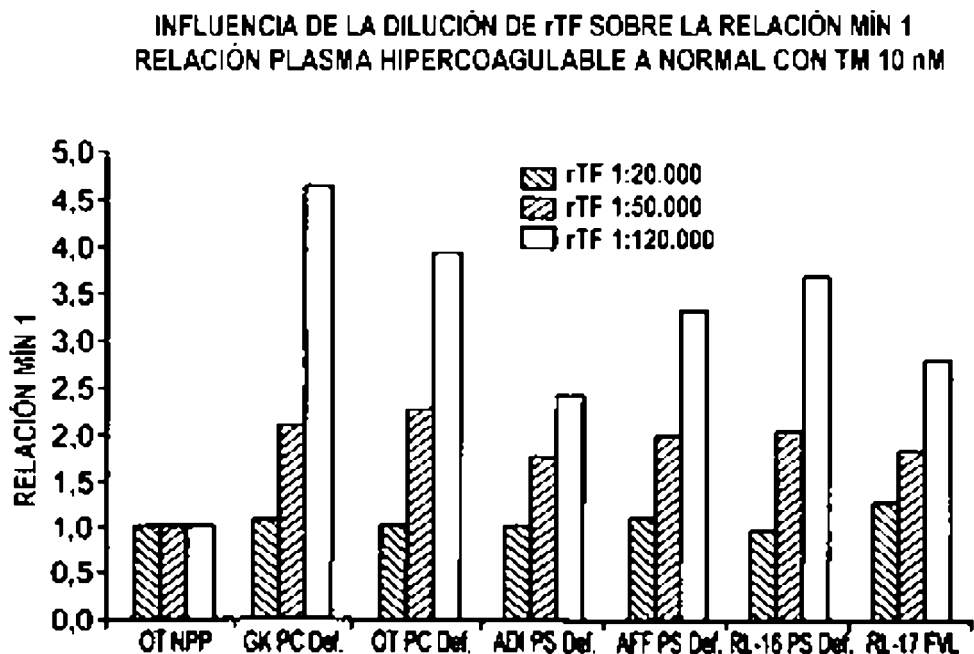


FIG. 9.

