



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 439**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/56** (2006.01)  
**G01N 33/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05729048 .8**  
96 Fecha de presentación : **30.03.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1730299**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **Kit para medir la producción de trombina en una muestra de sangre o plasma de un paciente.**

30 Prioridad: **31.03.2004 US 816099**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.11.2011**

73 Titular/es: **BAXTER INTERNATIONAL Inc.**  
**One Baxter Parkway**  
**Deerfield, Illinois 60015, US**  
**BAXTER HEALTHCARE SA.**

72 Inventor/es: **Varadi, Katalin;**  
**Turecek, Peter;**  
**Keil, Brigitte;**  
**Peyrer-Heimstaett, Sylvia y**  
**Schwarz, Hans-Peter**

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 367 439 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

Kit para medir la producción de trombina en una muestra de sangre o plasma de un paciente

5 La presente invención se refiere a un kit para medir la producción de trombina en una muestra de sangre o plasma de un paciente o en una muestra de factores de coagulación. La invención también se refiere a un proceso para la preparación de un reactivo para el kit.

10 La hemofilia A es un trastorno de la coagulación sanguínea hereditario. Está producida por una actividad deficiente de la proteína plasmática factor VIII, que afecta a las propiedades de coagulación de la sangre. El tratamiento estándar para pacientes de hemofilia A es la infusión de concentrados de factor VIII para sustituir el factor de coagulación defectuoso. Sin embargo, los pacientes de hemofilia A que desarrollan inhibidores del factor VIII durante la  
 15 terapia sustitutiva no responden a la mencionada terapia y se tratan con preparados que contienen factores de coagulación activados (denominados agentes de by-pass – agentes de desvío) para lograr una hemostasia independiente del factor VIII mediante mecanismos de by-pass (derivación). Tanto los concentrados de complejo de protrombina activada (APCC), como FEIBA (Factor Eight Inhibitor By-passing Activity - actividad de derivación del inhibidor de factor VIII – APCC derivado de plasma), que activa la vía intrínseca o común, y el factor activado VIIa (rFVIIa), tal como NovoSeven (VIIa recombinante), destinado a actuar a través de la vía extrínseca, son opciones adecuadas para el tratamiento de pacientes de inhibición del factor VIII.

20 No es posible la supervisión directa del principio activo para uno u otro régimen de tratamiento, ya que los componentes activos de los agentes de derivación interactúan inmediatamente con las proteínas del sistema hemostático para inducir una activación de la cascada de coagulación. Todos los ensayos existentes miden marcadores indirectos, cuyo valor es limitado para evaluar la eficacia del agente de derivación, debido a que la especificidad y la sensibilidad dependen de las condiciones de ensayo específicas y debido a que estos ensayos no aportan información alguna sobre el estado de la actividad global del sistema hemostático.

25 El objetivo final de la cascada de coagulación es la transformación de la protrombina en trombina, la cual, a su vez, induce la formación de coágulos mediante la activación del fibrinógeno. Por tanto, la producción de trombina es una función fundamental del plasma en la hemostasis. Actualmente no existe un ensayo rutinario que evalúe cuantitativamente la capacidad de formación de trombina en una muestra de plasma. Los tiempos de coagulación, tales como el tiempo de protrombina (PTT), el tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) y el tiempo de coagulación de trombina (TCT), no reflejan la producción de trombina global, ya que la mayoría de la trombina se forma después del instante de la coagulación y, por tanto, no son sensibles a la hipercoagulación y, posiblemente, tampoco a estados de  
 30 hipocoagulación. El ensayo PTT mide el tiempo de coagulación de la vía extrínseca y común, el ensayo aPTT mide el tiempo de coagulación de la vía intrínseca y común, mientras que el ensayo TCT sólo mide el tiempo de coagulación de la vía común. Hemker y col. (1986, Thromb. Haemost. 56:9-17) fueron los primeros en sugerir la medida de la producción de trombina en el plasma del paciente mediante la evaluación del potencial de trombina endógena. La producción de trombina es un proceso dinámico. La concentración de trombina real depende de la velocidad de activación e inactivación de las reacciones y, por tanto, refleja la eficiencia del sistema hemostático para controlar el sangrado. Hemker y col. (1995, Thromb. Haemost. 74:134-138) definieron el potencial de la trombina como la capacidad global del plasma para formar trombina después de la inducción de la coagulación y propusieron el uso de este parámetro como indicador sensible de todas las formas de anticoagulación.

35 Sultán y Loyer (1993, J. Lab. Clin. Med. 121:444-452) utilizaron tal ensayo de producción de trombina para la evaluación *in vitro* de la actividad de corrección del inhibidor de factor VIII en concentrados de complejo de protrombina activada, en concentrados de complejo de protrombina y de factor VIIa en plasma de pacientes con inhibidores de factor VIII. También existen otros informes de pruebas similares utilizadas para evaluar la eficacia de los agentes de derivación del factor VIII, aunque, debido a su complejidad técnica, las pruebas no se han aplicado al uso rutinario.

45 Turecek y col. (2003, Pathophysiol. Haemost. Thromb. 33:16-22) también describieron ensayos de producción de trombina; sin embargo, no utilizaron componentes liofilizados. Por otra parte, existe la opinión común de que la liofilización disminuye la actividad del factor tisular.

Además, la patente US-5.418.141 describe un artículo y un método de ensayo para realizar pruebas de tiempo de protrombina con un reactivo seco y la WO 98/48283 describe reactivos líquidos y liofilizados para determinar el tiempo de protrombina y/o los niveles de fibrinógeno en una muestra de plasma.

50 Todos los ensayos conocidos del estado de la técnica tienen el inconveniente de que los componentes sólo se pueden dosificar parcialmente antes de aplicar el ensayo. Por tanto, es necesaria una gran cantidad de fases de preparación para utilizar estas pruebas, haciendo así que éstas sean incómodas y susceptibles de error durante la manipulación. Además, estos ensayos requieren mucho tiempo.

55 Por tanto, existe la necesidad de un sistema de prueba que permita la detección y determinación de cambios, por ejemplo cambios que dependan del tratamiento, en la cinética de la producción de trombina en una muestra de sangre o plasma de un paciente y que solucione los problemas antes mencionados.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un kit para medir la producción de trombina en una muestra de sangre o plasma de un paciente o en una muestra de factores de coagulación. El kit comprende un complejo liofilizado de factor tisular (TF)/fosfolípido (PL) y una mezcla liofilizada que contiene un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y de  $\text{CaCl}_2$ , donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa. Además, el kit de la presente invención también puede contener cualquier agente auxiliar, por ejemplo tampones, sales, por ejemplo  $\text{CaCl}_2$ , estándares de trombina, estándares de FEIBA, etc., en forma congelada o liofilizada. El kit de la presente invención puede estar presente en cualquier forma, por ejemplo inmovilizado o en un soporte.

Sorprendentemente, se ha descubierto que un complejo liofilizado TF/PL y una mezcla liofilizada que contiene un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$ , donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa, proporcionan un sistema de ensayo simple, eficiente, rápido y reproducible para medir la producción de trombina en una muestra. El kit de la presente invención proporciona al menos un complejo liofilizado de TF/PL y una mezcla liofilizada que contiene un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$ , donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa, en una forma liofilizada fácilmente soluble, con lo cual sólo se necesita la adición a ensayar. El complejo liofilizado de TF/PL y la citada mezcla liofilizada que contiene un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$  del kit reivindicado también se pueden inmovilizar sobre un soporte, tal como la superficie interna de un vial o el pocillo de una placa microtitulada, con lo cual el ensayo de producción de trombina se lleva a un formato de ensayo conocido del tipo ELISA convencional, haciendo de él un tipo de ensayo muy conveniente. El kit de la presente invención proporciona al menos la misma sensibilidad en la prueba de producción de trombina que los ensayos del estado de la técnica utilizando componentes congelados. Por tanto, el ensayo de producción de trombina desarrollado con el kit de la presente invención permite un diagnóstico rápido del estado activo global del sistema hemostático en un paciente. Además, es posible detectar cambios dependientes del tratamiento en la cinética de la producción de trombina, por ejemplo después de la administración de una terapia de derivación a un paciente, por lo que es posible optimizar los intervalos de tratamiento y las dosis terapéuticas que ayudan a evitar complicaciones tromboticas por sobredosis.

Fig. 1: muestra los cambios de temperatura durante un ciclo de liofilización del complejo de TF/PL. El largo ciclo de liofilización con pequeños cambios de gradiente de temperatura durante el período de secado principal y el lento periodo de calentamiento de hasta un máximo de temperatura ambiente baja de  $20^\circ\text{C}$  conserva la actividad biológica del complejo TF/PL.

Fig.2: curvas de producción de trombina activadas con complejos congelados o liofilizados de TF/PL en diferentes muestras de plasma. Se demuestra que no hay diferencia en la producción de trombina (curva de concentración de trombina frente al tiempo) entre los complejos congelados y liofilizados de TF/PL. Tampoco hay diferencia en la producción de trombina en los complejos liofilizados de TF/PL en ausencia o presencia de sacarosa (utilizada como estabilizante). (A) Plasma humano normal con complejo congelado TF/PL. (B) Plasma humano normal con complejo liofilizado TF/PL. (C) Plasma inhibidor de factor VIII con complejo de TF/PL. (D) Plasma inhibidor de factor VIII con complejo liofilizado TF/PL. (E) Plasma inhibidor de factor VIII reconstituido con 0,5 U/ml de FEIBA con complejo congelado TF/PL. (F) Plasma inhibidor de factor VIII reconstituido con 0,5 U/ml de FEIBA con complejo liofilizado de TF/PL. (G) Plasma inhibidor de factor VIII reconstituido con 1 U/ml de FEIBA con complejo congelado TF/PL. (H) Plasma inhibidor de factor VIII reconstituido con 1 U/ml de FEIBA con complejo liofilizado de TF/PL. Los símbolos muestran: -■- sin sacarosa; -Δ- con 0,5% de sacarosa; -\*- con 5% de sacarosa.

Fig.3: comparación del pico de trombina, que es la mayor concentración de trombina observada en el transcurso del tiempo de formación e inactivación de trombina, medida en plasma humano normal y en plasma con inhibidor de factor VIII, sin FEIBA y reconstituido con 0,5 U/ml de FEIBA, después de activar con complejos congelados o liofilizados de TF/PL de diferentes composiciones. (A) Plasma humano normal con complejos de TF/PL que contienen cantidades bajas de TF. (B) Plasma humano normal con complejos de TF/PL que contienen cantidades altas de TF. (C) Plasma con inhibidor de factor VIII con complejos de TF/PL que contienen cantidades bajas de TF. (D) Plasma con inhibidor de factor VIII con complejos de TF/PL que contienen cantidades altas de TF. (E) Plasma con inhibidor de factor VIII reconstituido con 0,5 U/ml de FEIBA con complejos de TF/PL que contienen cantidades bajas de TF. (F) Plasma con inhibidor de factor VIII reconstituido con 0,5 U/ml de FEIBA con complejos de TF/PL que contienen cantidades altas de TF. Los símbolos muestran: -1- reactivos congelados; -2- reactivos liofilizados.

Fig.4: muestra que no hay diferencia en las curvas de producción de trombina obtenidas y en las concentraciones de trombina máximas obtenidas de estas curvas cuando el complejo de TF/PL y la mezcla que contiene un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  se liofilizan en un pocillo de una placa microtitulada de forma individual o conjuntamente. (A) Comparación de las curvas de producción de trombina obtenidas en plasma con inhibidor de factor FVIII reconstituido con 0,5 U/ml de FEIBA activado con complejos liofilizados de TF/PL y medido con mezclas liofilizadas que contienen un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  (-●-), activado con complejos liofilizados de TF/PL en un pocillo de una placa microtitulada y medido con mezclas liofilizadas que contienen un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  (-

\*-), activado con complejos liofilizados de TF/PL y medido con mezclas que contienen un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  liofilizado en un pocillo de una placa microtitulada, (- □ -) y complejos activados de TF/PL y medidos con mezclas que contienen un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  liofilizado en un pocillo de una placa de microtitulada (- ▲ -). (B) Comparación de las concentraciones de trombina máximas derivadas de un panel A medido en plasma humano normal, en plasma con inhibidor de FVIII sin reconstituir y reconstituido con 0,5 U/ml y con 1 U/ml de FEIBA activado con reactivos liofilizados individual o conjuntamente en un pocillo de una placa de microtitulación. Los símbolos: -1- activado con complejos liofilizados de TF/PL y medido con mezclas liofilizadas que contienen un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$ ; -2- activado con complejos liofilizados de TF/PL en un pocillo de una placa de microtitulación y medido con mezclas liofilizadas que contienen un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$ ; -3- activado con complejos liofilizados de TF/PL y medido con mezclas que contienen un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  liofilizado en un pocillo de una placa de microtitulación, -4- activado con complejos de TF/PL y medido con mezclas que contienen un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  ambos liofilizados en un pocillo de una placa de microtitulación.

5

10

15 Fig.5:

muestra la sensibilidad de la prueba de producción de trombina a las actividades de factor VIII y IX. (A) Cambios dependientes de la actividad de factor VIII del pico de trombina. La sección ampliada de esta figura muestra valores de la actividad de FVIII por debajo de 0,1 U/ml. (B) Cambios dependientes de la actividad de Factor IX del pico de trombina. La sección ampliada de esta figura muestra valores de la actividad de FIX por debajo de 0,1 U/ml.

20

Una realización de la invención es un kit para medir la producción de trombina en una muestra que comprende un complejo liofilizado de factor tisular (TF)/fosfolípido (PL) y una mezcla liofilizada que contiene un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$ , donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa.

25

El término "muestra" tal como se utiliza aquí se refiere a un fluido biológico, tal como sangre completa o plasma, por ejemplo, plasma enriquecido con glóbulos o plasma libre de glóbulos, de seres humanos o animales. La muestra puede obtenerse de individuos sanos o de individuos sospechosos de tener o que tienen un trastorno de la coagulación sanguínea, en concreto un trastorno asociado a la aparición de inhibidores de FVIII con o sin tratamiento. La muestra puede estar recién preparada o estar presente en estado congelado, por ejemplo en caso de muestras libres de glóbulos. La muestra también puede consistir en mezclas de proteínas purificadas de origen natural, sintético o recombinante y/o en otras preparaciones/reactivos con actividad hemostática.

30

La relación en peso entre TF y PL en el complejo liofilizado de TF/PL puede variar en función de su finalidad. Para el ensayo de producción de trombina, en general se prefiere una baja cantidad de TF y una baja cantidad de PL. En una realización preferente de la presente invención, la concentración de TF en el complejo TF/PL oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 1.000 pM y/o la concentración de PL en el complejo TF/PL oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ .

35

El FT del complejo TF/PL es o bien un factor tisular de longitud total o al menos una parte funcional del mismo. El factor tisular puede ser de origen natural o recombinante. La expresión "al menos una parte funcional del mismo" significa que cada parte del factor tisular presenta la misma función que el factor tisular de longitud total. En una realización preferente, se utiliza un factor tisular recombinante de longitud total.

40

El PL del complejo TF/PL puede ser de origen sintético o natural. La composición de las vesículas de PL depende de la importancia de su coagulación, es decir, de su papel en la coagulación sanguínea fisiológica. En una realización preferente de la presente invención, los fosfolípidos se seleccionan del grupo consistente en fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y mezclas de los mismos. Preferentemente, los fosfolípidos se seleccionan del grupo de 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleico-sn-glicero-3-fosfoserina (POPS) y 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE). En una realización preferente de la presente invención, la relación en peso PC/PS oscila entre aproximadamente 60/40 y aproximadamente 95/5, en base a la cantidad total de fosfolípidos, y la relación en peso PC/PS/PE se sitúa en el rango de aproximadamente 60/20/20 y aproximadamente 78/17/5 en base a la cantidad total de fosfolípidos.

45

El complejo TF/PL, así como la mezcla que contiene un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$ , pueden estar inmovilizados en un soporte de manera individual o conjunta. El término "inmovilizados" incluye la inmovilización en un soporte simplemente mediante liofilización o mediante una interacción o acoplamiento, tal como un acoplamiento covalente directamente o a través de una molécula de unión, con el soporte. Preferentemente, el complejo liofilizado TF/PL y la mezcla liofilizada que contiene un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$  se liofilizan conjuntamente en un soporte. La inmovilización se lleva a cabo de tal manera que la actividad biológica de los componentes, por ejemplo, TF, PL y el sustrato de trombina, se mantienen sustancialmente. El término "soporte" no tiene limitación específica alguna y se refiere por ejemplo a la superficie de un material inerte, tal como un material polimérico, que puede ser un polímero orgánico como poliamida o un polímero de vinilo (por ejemplo, poli(met)acrilato, poliestireno y alcohol de polivinilo, o sus derivados) o un polímero natural como celulosa, dextrano, agarosa, quitina y poliaminoácidos, o un material inorgánico como vidrio. El soporte puede tener cualquier configuración y forma, tal como

50

55

la superficie interior y el fondo de viales, microportadores, partículas, membranas, bandas, papeles, películas, perlas o placas, por ejemplo placas de microtitulación con pocillos.

5 Los sustratos de trombina con marcadores fluorescentes utilizados en la presente invención son conocidos en el estado de la técnica y preferentemente son altamente específicos para la trombina; es decir, sustancialmente no existen reacciones cruzadas con otras enzimas de coagulación o, si existen, son insignificantes, y preferentemente tienen poca afinidad con la trombina ( $K_m$  alta) para permitir una cinética a largo plazo. El sustrato de trombina comprende una fracción marcada donde la fracción marcada puede escindirse mediante trombina. El marcador de esta fracción es un marcador fluorescente. En una realización preferente de la presente invención, la fracción marcada del sustrato de trombina comprende un fluoróforo. Por otra parte, la fracción marcada comprende preferentemente un péptido, tal como un dipéptido o un tripéptido.

10 Según una realización de la invención, el kit comprende además al menos un estándar de trombina como referencia.

El complejo liofilizado TF/PL de la presente invención puede prepararse mediante un proceso en el que es posible obtener un TF muy activo, manteniéndose su actividad durante el proceso de liofilización.

15 El proceso para preparar el complejo TF/PL comprende los siguientes pasos:

- a) preparar vesículas de fosfolípidos con un diámetro que oscila entre aproximadamente 200 y aproximadamente 300 nm, preferentemente mediante cualquier método conocido del estado de la técnica, tal como extrusión o sonicación;
- b) liofilizar las vesículas de fosfolípidos para obtener un polvo;
- 20 c) reconstituir el polvo liofilizado con agua para inyección y mezclarlo con un factor tisular;
- d) congelar y descongelar la mezcla obtenida en el paso (c) para formar un complejo TF/PL;
- e) estabilizar el complejo TF/PL mediante incubación a unos 4°C durante entre aproximadamente 24 y aproximadamente 72 horas y, opcionalmente, diluir el complejo TF/PL a una concentración "lista para el uso" adecuada, y
- 25 f) liofilizar el complejo TF/PL.

En el proceso para preparar el complejo TF/PL, la adición de conservantes no es esencial. El uso de conservantes haría que la preparación del ensayo fuera más larga y costosa. Además, algunos de estos conservantes, como la albúmina, no son adecuados, ya que es sabido que la albúmina interactúa con muchas proteínas, perjudicando así la prueba.

30 En el paso (d) del proceso, el ciclo de congelación y descongelación se lleva a cabo de preferencia congelando el factor tisular con las vesículas de fosfolípidos a aproximadamente -20°C durante la noche y luego descongelando durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente.

La presente invención incluye un proceso para preparar una mezcla que contiene un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$ , dando como resultado una preparación fácilmente soluble en agua, donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa. Las preparaciones de sustrato de trombina conocidas del estado de la técnica requieren una disolución inicial en un tampón adecuado, a menudo conteniendo DMSO, seguido de otra disolución con agua. La adición posterior de  $\text{CaCl}_2$  a las preparaciones de sustrato de trombina del estado de la técnica producen un precipitado difícil de disolver y, por tanto, difícil de usar.

40 El proceso para preparar la mezcla liofilizada que contiene un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$  comprende los siguientes pasos:

- a) disolver el sustrato de trombina en un disolvente adecuado;
- b) añadir  $\text{CaCl}_2$  y disolver el precipitado formado que contiene el sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$ , en particular para obtener una solución límpida, y
- 45 c) liofilizar la mezcla que contiene el sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$ , donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa.

La disolución del paso (b) se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 37°C hasta que se consigue una solución límpida.

Por otra parte, la presente invención se refiere a un método para medir la producción de trombina en una muestra, por ejemplo obtenida de un paciente, que comprende los pasos de:

- 5 a) proporcionar un complejo liofilizado TF/PL y una mezcla liofilizada que contiene un sustrato de trombina como se ha definido anteriormente y CaCl<sub>2</sub>, donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa.
- b) poner en contacto la muestra con dicho complejo liofilizado TF/PL y dicha mezcla liofilizada que contiene el sustrato de trombina y CaCl<sub>2</sub>; y
- c) medir la producción de trombina en la muestra.

10 Cuando se utiliza el kit de la presente invención, donde se emplea un sustrato de trombina con una fracción de marcador fluorescente, el desarrollo de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo liberado se puede controlar de forma continua. La tasa de desarrollo de la intensidad de fluorescencia (unidades de fluorescencia (FU)) se calcula para cada lectura (FU/min) y se puede transformar en concentraciones equivalentes de trombina (nM) utilizando una curva de referencia preparada midiendo la tasa de transformación de sustrato con un estándar de trombina.

15 El kit y el método de la presente invención son altamente sensibles para ensayar uno o más factores de coagulación de la cascada de coagulación sanguínea vía la producción de trombina. En consecuencia, el kit y el método de la presente invención se pueden utilizar para el seguimiento de cualquier tratamiento relacionado con la hemostasia, aumentando o disminuyendo la actividad de cualquier factor de coagulación, por ejemplo monitorizando el tratamiento con agentes de derivación FVIII o antagonistas de vitamina K. Por otra parte, el seguimiento del tratamiento con terapéuticos, tales como de derivación, permitirá optimizar los intervalos de tratamiento y la dosificación de estos terapéuticos y ayudará a evitar complicaciones trombóticas por sobredosis.

20 Además, los reactivos liofilizados del kit de la presente invención tienen una fecha de caducidad posterior y prorrogable si se compara con un ensayo que utiliza componentes congelados. Por otra parte, no se necesitan fases de dilución cuando se utiliza el kit de ensayo que se reivindica, ya que el manejo de tal kit de ensayo es más fácil y cómodo.

La presente invención se ilustra con más detalle en los siguientes ejemplos, sin limitarse a los mismos.

**Ejemplos**

25 **Ejemplo 1: Preparación de un complejo liofilizado y congelado de TF/PL**

Se prepara un factor tisular que tiene vesículas de fosfolípidos (complejo TF/PL) utilizando un TF de longitud completa recombinante (American Diagnostica Inc. Greenwich, CT, EEUU) y PL sintéticos (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EEUU). La preparación comprende los siguientes pasos:

30 Se preparan vesículas de fosfolípidos compuestas de 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleico-sn-glicero-3-fosfoserina (COP) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) mediante el método de extrusión de Hope y col. (Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR: "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential". Biochim Biophys Acta 812:55, 1985) utilizando un dispositivo de extrusión de Lipex Biomembranes, Inc. (Vancouver, Canadá) equipado con dos filtros de policarbonato apilados (tamaño de poro 1.000 nm). La preparación de vesículas se diluye con 20 mM de tampón TRIS pH 7,4 conteniendo 150 mM NaCl (TBS) a una concentración de 1,27 mM y se liofiliza después de la adición de un 5% en peso/volumen de sacarosa. Después de la reconstitución del polvo liofilizado con agua destilada, las vesículas tienen un diámetro medio de 260 nm, según se determinado por dispersión de luz dinámica (Zetasizer 4, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

40 Se combinan las vesículas de TF con vesículas de PL: una mezcla inicial de entre 2 y 700 nM de TF con 850 µM de vesículas de PL se congela a -20°C durante la noche, luego se descongela durante 30 minutos a temperatura ambiente y se diluye 6,7 veces con TBS. Las vesículas de TF/PL se equilibran a 4°C durante 48 a 168 horas y se congelan en alícuotas o se liofilizan en presencia o ausencia de entre un 0,5 y un 5% de sacarosa. Como segunda opción, se diluyen 40 veces para proporcionar las concentraciones de trabajo adecuadas de 3,2 µM de PL y diversas concentraciones de TF y se congelan en alícuotas o se liofilizan en presencia o ausencia de entre un 0,5 y un 5% de sacarosa.

**Tabla 1. Datos principales del ciclo de liofilización**

Carga	Congelación		Secado principal			Secado final		
	Temp.	Tiempo	Presión	Temp.	Tiempo	Presión	Temp.	Tiempo
+20°C	-45°C	2 h	0,1mbar	-45°C → -30°C	27 h	<0,03 mbar	hasta 20°C	6 h

La figura 1 muestra los cambios de temperatura durante el ciclo de liofilización.

**Ejemplo 2: Producción de trombina activada con complejo liofilizado o congelado de TF/PL en varias muestras de plasma**

La producción de trombina se activa mediante un complejo TF/PL preparado como se ha descrito anteriormente que contiene 18 pM de TF y 3,2 μM de PL, donde el PL está compuesto por una proporción de un 80% en peso de DOPC y un 20% en peso de POPS. El complejo liofilizado de TF/PL se disuelve en agua para inyección (a una concentración final de 18 pM de TF y 3,2 μM de PL) y 10 μl de esta solución acuosa se añaden a 50 μl de 1 mM sustrato de trombina Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem AG, Bubendorf, Suiza) premezclado con CaCl<sub>2</sub>. Como comparación, 10 μl de un complejo congelado de TF/PL (18 pM de TF y 3,2 μM de PL) se mezclan con 50 μl del sustrato de trombina mencionado anteriormente. La adición de 40 μl de muestra de plasma inicia la reacción. Los componentes se incuban a 37°C.

El sustrato de trombina se escinde mediante la trombina generada y se libera una fracción que contiene fluoróforo. El aumento de la intensidad de la fluorescencia, que es proporcional a la concentración de la trombina generada, se supervisa continuamente a 37°C mediante lectura automática, cada minuto, hasta 120 minutos, utilizando un lector de fluorescencia de microplacas FL600 (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont. EEUU) a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm.

La tasa de desarrollo de la intensidad de fluorescencia [unidades de fluorescencia (UF)] se calcula para cada lectura (FU/min) y se transforma en concentraciones equivalentes de trombina (nM) utilizando una curva de referencia preparada mediante la medición de la tasa de conversión de sustrato por una trombina purificada añadida en lugar de la muestra de plasma.

Se comparan los efectos de la activación de los complejos congelados y liofilizados de TF/PL (que contienen 18 pM de TF y 3,2 μM de PL) utilizando un plasma humano normal (FACT, George King Bio-Medical Inc. Overland Parks, KS, EEUU) un inhibidor de plasma FVIII sin reconstituir y reconstituido con 0,5 U/ml de FEIBA (ambos productos de Baxter, Viena, Austria).

Las curvas de generación de trombina se muestran en la figura 2.

**Ejemplo 3: Comparación del efecto de la activación de la producción de trombina de complejos congelados y liofilizados TF/PL con diferentes composiciones**

Los complejos de TF/PL se preparan como se describe en el Ejemplo 1, pero compuestos por diversos fosfolípidos en una concentración de 3,2 μM con 18 pM de TF u 89 pM de TF. Los complejos de TF/PL se congelan en alícuotas o se liofilizan sin sacarosa con el ciclo de liofilización descrito en el Ejemplo 1.

**Tabla 2. Composición de complejos de TF/PL**

Composición de PL (proporción en peso)		Concentración de PL (μM)	Concentración de TF (pM)
PC:PS	80/20	3,2	18
PC:PS	60/40	3,2	18
PC:PS	95/5	3,2	18
PC:PS:PE	78/17/5	3,2	18
PC:PS:PE	60/20/20	3,2	18
PC:PS	80/20	3,2	89
PC:PS	60/40	3,2	89
PC:PS	95/5	3,2	89
PC:PS:PE	78/17/5	3,2	89
PC:PS:PE	60/20/20	3,2	89

PC: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC); PS: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoserina (POPS); PE: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE)

Las curvas de producción de trombina se miden como se describe anteriormente. El parámetro más característico, el pico de trombina, es decir la concentración de trombina máxima con el tiempo de formación e inactivación de trombina, se calcula y dibuja como una función de los complejos de TF/PL. La figura 3 muestra las concentraciones pico de trombina medidas en plasma humano normal, en plasma con inhibidor de factor FVIII y reconstituidas con 0,5 U/ml de FEIBA una vez activadas con complejos congelados o liofilizados de TF/PL.

No hubo diferencias en ninguna de las muestras de plasma investigadas ya se hubiera activado la generación de trombina con los complejos congelados o liofilizados de TF/PL.

**Ejemplo 4: Liofilización de complejos de TF/PL y mezclas que contienen un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  en pocillos de placas de microtitulación**

El ensayo de producción de trombina se lleva a cabo en los pocillos de placas microtituladas. Por tanto, los complejos de TF/PL y/o la mezcla que contiene el sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  se liofilizan directamente de manera individual o conjunta en los pocillos de placas de microtitulación. Cuando los dos componentes se liofilizan de forma conjunta en un pocillo de una placa de microtitulación, sólo hay que añadir la muestra de plasma que se va a probar en tal realización lista para el uso. La figura 4 muestra que no hay diferencia en las curvas de producción de trombina obtenidas y en las concentraciones de trombina máximas ya los complejos de TF/PL y la mezcla que contiene un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$  se liofilicen de manera individual o conjunta en el pocillo de una placa microtitulada.

**Ejemplo 5: Sensibilidad del ensayo de producción de trombina**

El ensayo de producción de trombina es muy sensible a cualquier factor de coagulación solo o en grupos. Por tanto, el ensayo también puede utilizarse para determinar la eficacia de una terapia sustitutiva, así como una terapia compleja con, por ejemplo, agentes de derivación FVIII. Como se observa en la figura 5, el ensayo es especialmente sensible en un rango de actividad baja, incluso por debajo de 0,01 U/ml de factores de coagulación, que es el límite de detección general de las pruebas habituales cromogénicas y de coagulación. Dado que hay diferencias en la tendencia al sangrado entre los hemofílicos graves, es decir, pacientes con una actividad de FVIII o FIX por debajo de 0,01 U/ml, la posibilidad de medir las actividades del factor en este bajo rango ayuda a evitar el riesgo de sangrado espontáneo de estos pacientes.

**Ejemplo 6: Preparación de una mezcla soluble en agua congelada y liofilizada que contiene sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$**

El sustrato de trombina Z-Gly-Gly-Arg-AMC/HCl se disuelve en 25 mM de tampón HEPES pH 7,35 que contiene 175 mM NaCl y 10% de DMSO, mediante agitación magnética durante 5 minutos, seguido de la adición de  $\text{CaCl}_2$ . En ese momento aparece un precipitado, que se puede disolver por agitación vigorosa durante 15 minutos a 37°C, seguido por una hora de agitación suave a temperatura ambiente. La solución límpida resultante se compone de una concentración final de 5 mM de sustrato de trombina y 75 mM de  $\text{CaCl}_2$ . La solución se diluye además con tampón HEPES pH 7,35 que contiene 175 mM de NaCl (sin DMSO) a una concentración final de 1 mM de sustrato de trombina y 15 mM de  $\text{CaCl}_2$ , se congela en alícuotas o se liofiliza para proporcionar una solución "lista para el uso" después de la disolución en agua para inyección. Asimismo, la solución concentrada (es decir, la solución que contiene 5 mM de sustrato de trombina y 75 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) se puede congelar en alícuotas o liofilizar y, opcionalmente, diluir a una concentración adecuada antes de su uso.



## REIVINDICACIONES

1. Kit para medir la producción de trombina en una muestra, comprendiendo un complejo liofilizado de factor tisular (TF)/fosfolípido (PL) y una mezcla liofilizada de un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$ , donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa.
- 5 2. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de TF en el complejo liofilizado de TF/PL oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 1.000 pM.
3. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de PL en el complejo liofilizado de TF/PL oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ .
- 10 4. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho TF o al menos una parte funcional del mismo es de origen natural o recombinante.
5. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho PL es de origen natural o sintético.
6. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho PL se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y mezclas de los mismos.
- 15 7. Kit según la reivindicación 6, caracterizado porque la relación en peso PC/PS oscila entre aproximadamente 60/40 y aproximadamente 95/5.
8. Kit según la reivindicación 6, caracterizado porque la relación en peso PC/PS/PE se encuentra en el rango de aproximadamente 60/20/20 y aproximadamente 78/17/5, en base a la cantidad total de fosfolípidos.
9. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además al menos un estándar de trombina.
- 20 10. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque el complejo liofilizado de TF/PL se inmoviliza sobre un soporte.
11. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla liofilizada de un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$  se inmoviliza sobre un soporte.
12. Kit según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque el soporte es la superficie interna de un vial o de pocillos de una placa o de una banda ELISA.
- 25 13. Proceso para preparar una mezcla liofilizada de un sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$ , que comprende los siguientes pasos:
  - a) disolver un sustrato de trombina con un marcador fluorescente en un disolvente adecuado;
  - b) añadir  $\text{CaCl}_2$  y disolver el precipitado formado del sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$ ; y
  - 30 c) liofilizar la mezcla del sustrato de trombina con un marcador fluorescente y  $\text{CaCl}_2$ , donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa.
14. Proceso según la reivindicación 13, caracterizado porque en el paso (c) se inmoviliza la mezcla sobre un soporte mediante liofilización.
- 35 15. Proceso según la reivindicación 14, caracterizado porque el soporte es la superficie interna de un vial o de pocillos de una placa o de una banda ELISA.
16. Método para medir la producción de trombina en una muestra, que comprende los pasos de:
  - a) poner en contacto la muestra con un complejo liofilizado de factor tisular (TF)/fosfolípido (PL) y una mezcla liofilizada de un sustrato de trombina y  $\text{CaCl}_2$ , donde la mezcla liofilizada forma una solución límpida cuando se disuelve en una solución acuosa;
  - 40 b) medir la producción de trombina en dicha muestra.
17. Método según la reivindicación 16, caracterizado porque la muestra se selecciona del grupo consistente en sangre completa, plasma y mezclas que contienen proteínas purificadas de origen natural, sintético o recombinante con actividad hemostática.

FIGURA 1

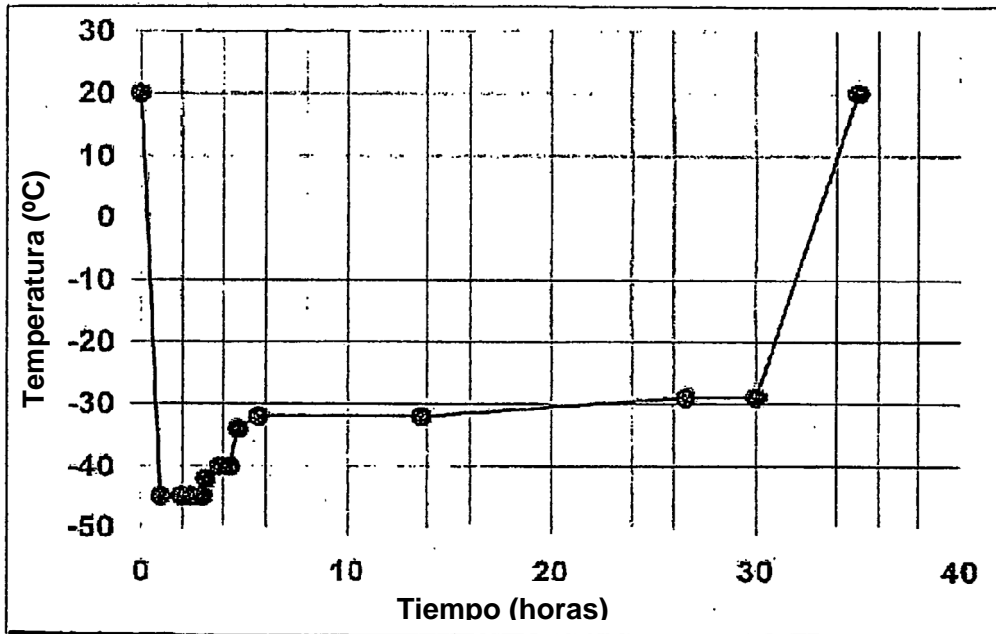


FIGURA 2

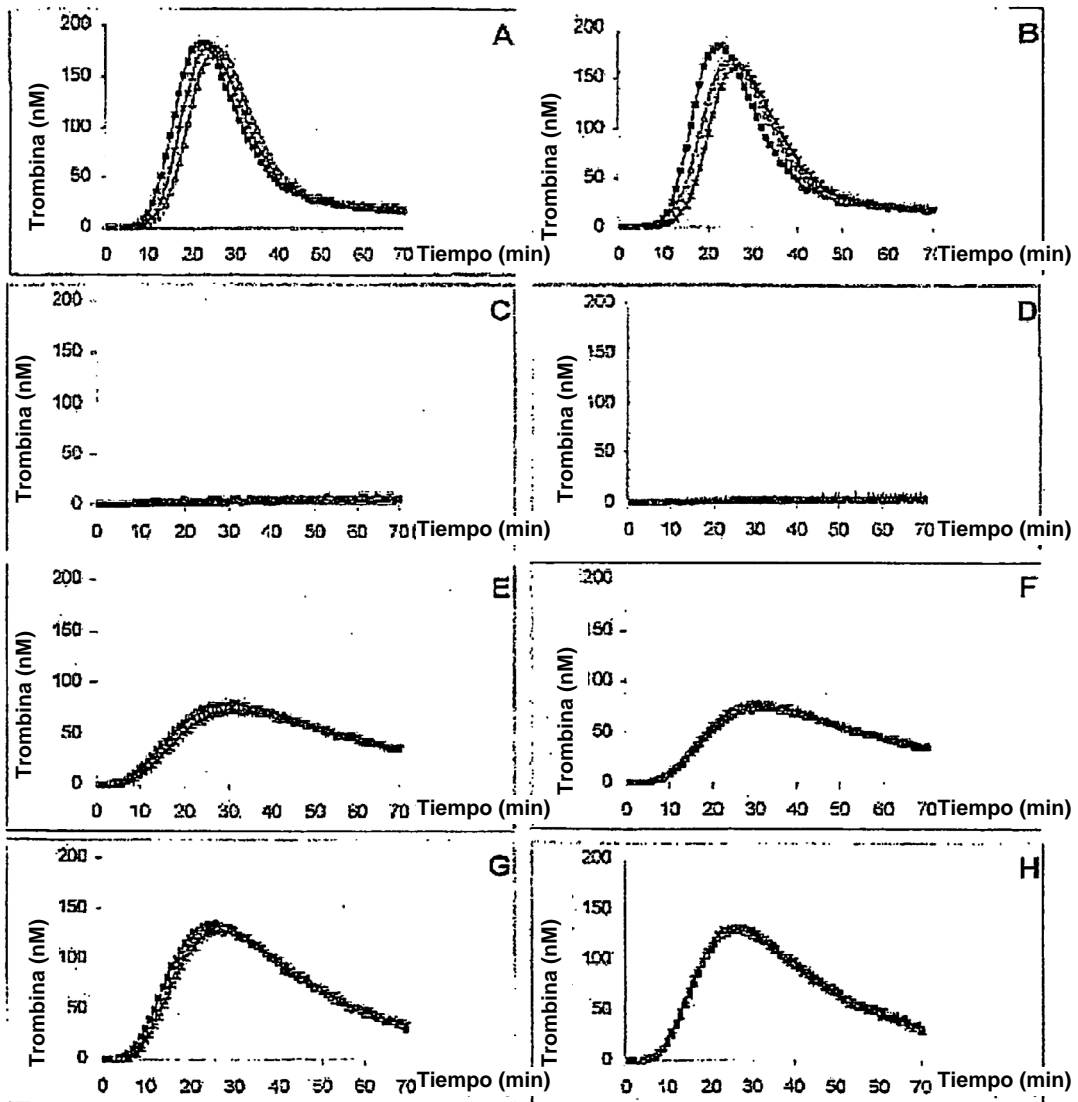


FIGURA 3

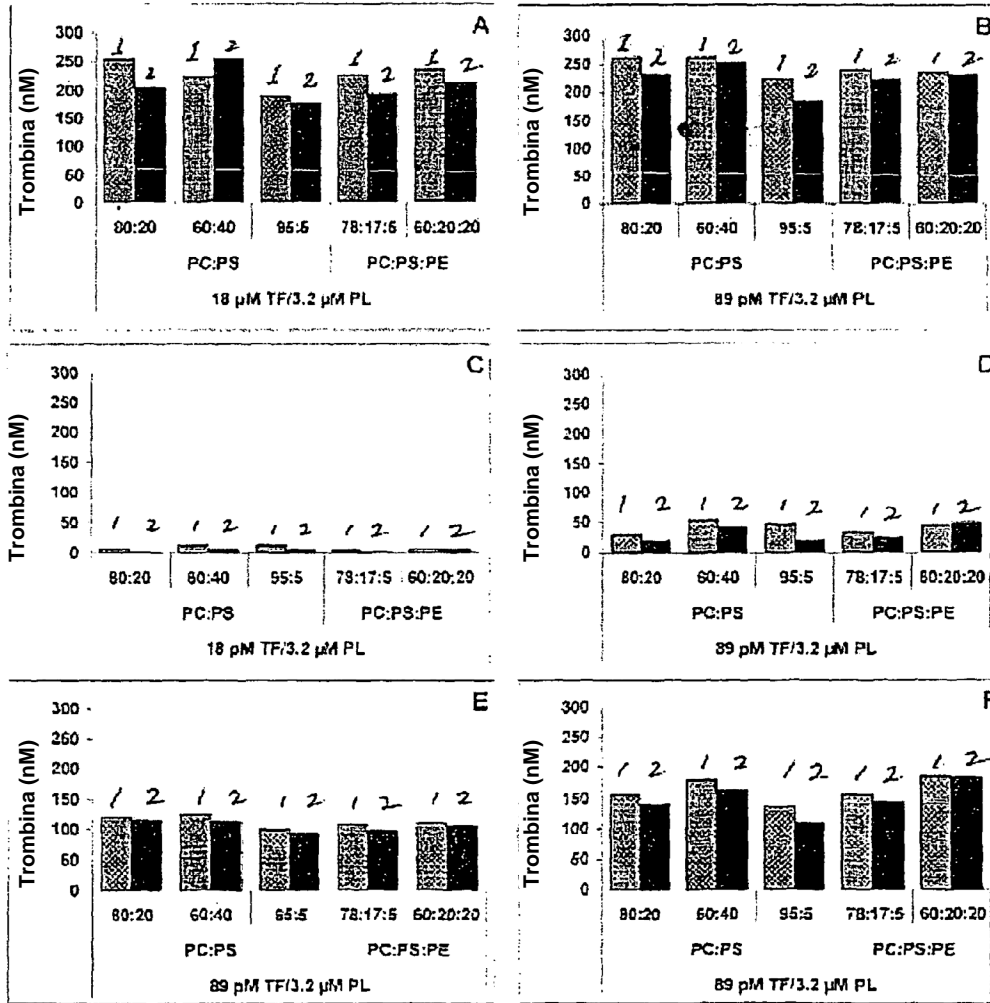


FIGURA 4

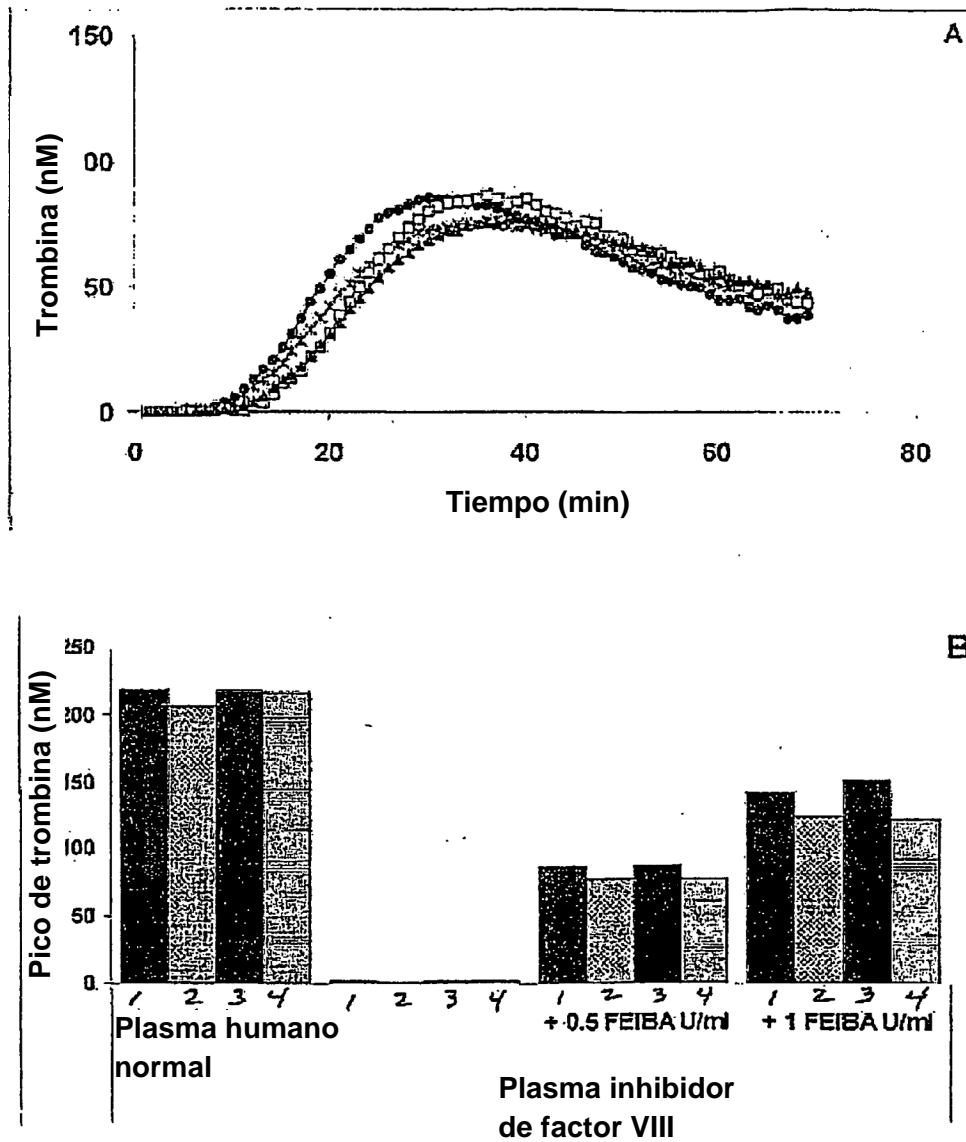


FIGURA 5

