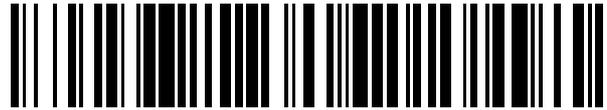


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 599**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/56

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09011792 .0**

96 Fecha de presentación: **16.09.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2177625**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

54 Título: **Pruebas de coagulación sanguínea**

30 Prioridad:
02.10.2008 EP 08017334

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2012

73 Titular/es:
**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:
**Kappel, Andreas;
Lichte, Andrea;
Teigelkamp, Stefan;
Zander, Norbert y
Schelp, Carsten**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 378 599 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

Pruebas de coagulación sanguínea

La invención se relaciona con métodos para determinar la actividad de un factor de coagulación proteolítica de la cascada de coagulación de la sangre en un fluido corporal tal como sangre entera o plasma.

5 El proceso de la coagulación de la sangre y la subsecuente disolución del coágulo, después de la reparación del tejido lesionado, es llamado hemostasis, el cual es un proceso altamente complejo que involucra tanto componentes celulares como bioquímicos. La hemostasis está compuesta de cuatro principales eventos que ocurren en un orden definido que sigue a la lesión vascular. La coagulación se inicia casi instantáneamente después de que una lesión en el vaso sanguíneo daña el endotelio. La fase inicial del proceso se refiere a una constricción vascular, la cual limita el flujo de
10 sangre al área de la lesión. A continuación, las plaquetas llegan a ser activadas por trombina e inmediatamente agregadas en el sitio de la lesión para formar un tapón hemostático en el sitio de la lesión; este proceso es llamado inicialmente hemostasis. La formación del tapón es estimulada por la proteína fibrinógeno. La hemostasis secundaria ocurre simultáneamente; las proteínas en el plasma sanguíneo, llamadas factores de coagulación, responden en una cascada compleja para formar hebras de fibrina, las cuales fortalecen el tapón de plaquetas. El factor de coagulación actúa en dos cascadas enlazadas íntimamente, referidas a rutas extrínsecas e intrínsecas. Pruebas de diagnóstico inicial de pacientes de los cuales se sospecha desórdenes de sangrado es usualmente llevado a cabo con el así llamado pruebas de coagulación, el tiempo de tromboplastina activada parcial (aPTT) y el tiempo de protrombina (PT). Además, estas pruebas son también usadas para monitorizar terapias anticoagulantes. Mientras el aPTT es principalmente usado para la detección de deficiencias en factores de la ruta intrínseca y para monitorizar la terapia heparina, el PT es usado para la detección de la deficiencia en factores de la ruta extrínseca y para monitorizar la terapia de antagonistas de vitamina K. Ambos, el aPTT y el PT, pueden también ser usados para la detección de deficiencias de factores simples por mezcla de un plasma que es deficiente para el factor de coagulación para ser cuantificada con la muestra del paciente.

25 Muchos pacientes con desórdenes de sangrado heredado tienen prolongación del aPTT, el PT o ambos. Un paciente con un prolongado aPTT y un normal PT es considerado que tiene un defecto en la ruta de coagulación intrínseca. El nombre indica que todos los componentes de la prueba aPTT excepto kaolin, son "intrínsecos al plasma". Por otro lado, un paciente con un prolongado PT y un normal aPTT tiene un defecto en la ruta de coagulación extrínseca (el factor de tejido "es intrínseco" al plasma). La prolongación de ambos aPTT y PT sugiere que el defecto yace en una ruta común.

30 En la reacción PT, la coagulación se inicia en una muestra de plasma del paciente por activación de la ruta extrínseca, esto es por adición de una mezcla de un factor de tejido, fosfolípidos e iones calcio. Subsecuentemente, se determina el tiempo hasta que la trombina que es generada ha convertido suficiente fibrinógeno en un coágulo de fibrina visible. Este es un método de detección relativamente insensible que también requiere volúmenes de muestra altos.

35 La ruta extrínseca (o factor de tejidos) genera una "explosión de trombinas", la cual es un proceso por el cual la trombina, el más importante constituyente de la cascada de coagulación en términos de su papel de activación de retroalimentación, es liberada instantáneamente. Siguiendo al daño del vaso sanguíneo o tejido, el Factor tejido (TF) es liberado, formando un complejo con Factor VII y activándolo. El Factor TF complejo VIIa activa entonces los Factores IX y X. el Factor Xa y su cofactor el Factor Va forma el complejo de protrombinasa, el cual activa la protrombina a trombina. La trombina subsecuentemente activa otros componentes de la cascada de coagulación, incluyendo los factores V y VII, y activa y libera el factor VII de estar enlazado al factor de von Willebrand (vWF). Finalmente, la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina insoluble y por lo tanto genera un coágulo. El factor XIII subsecuentemente estabiliza el coágulo de fibrina.

40 La ruta intrínseca (o contacto de activación) comienza con la formación del complejo primario que consiste de fibrinógeno de alto peso molecular (HMWK), prekalikreina, y Factor XII. La prekalikreina es convertida en kalikreina y activa el Factor XII a XIIa. El Factor XIIa convierte al Factor XI en Factor XIa. El Factor XIa activa el Factor IX, el cual junto con su cofactor Factor VIIIa forma el complejo tenasa, el cual activa el Factor X a Factor Xa. Así en la ruta extrínseca, el factor Xa y su cofactor el factor Va forma el complejo protrombinasa, el cual activa de nuevo la protrombina a trombina.

45 El concepto de rutas "intrínseca" y "extrínseca" ha servido por muchos años como un modelo útil para la coagulación. La evidencia ha mostrado que las rutas no son redundantes pero están altamente interconectadas. Por ejemplo, el factor tejido/Factor complejo VIIa activa no solo el Factor X sino también el Factor IX de la ruta intrínseca. Adicionalmente los pacientes con severa deficiencia del Factor VII pueden sangrar aunque la ruta intrínseca esté intacta. Además, el sangrado severo asociado con deficiencias del Factor VIII o IX no se esperaría necesariamente si la ruta extrínseca sola fuera suficiente para alcanzar la hemostasis normal. Los sistemas intrínseco y extrínseco convergen en un factor X a una ruta común simple que es finalmente responsable para la producción de trombina (Factor IIa). Aunque son inicialmente mecanismos distintos, las rutas intrínseca y extrínseca convergen en una ruta común que lleva a la
55 formación de un coágulo.

5 La cuantificación exacta de las actividades bioquímicas de las rutas completas tanto extrínseca como intrínseca así como de sus factores de coagulación respectivos es altamente importante para el diagnóstico de desórdenes de sangrado, trombofilia, y también para monitorización de la terapia de anticoagulante, y similares. Métodos de pruebas actuales para la actividad de las rutas miden usualmente fotométricamente el tiempo hasta la aparición de un coágulo de fibrina, después de la respectiva ruta que ha sido disparada en una muestra de plasma. Versiones modificadas de este principio básico existen para la cuantificación de las actividades de los factores de coagulación simple. Estos métodos fotométricos a menudo pierden la sensibilidad que es requerida para la cuantificación exacta de las bajas cantidades de algunos factores de coagulación tal como Factor VIII, que generalmente requiere volúmenes de muestra altos, y puede por lo tanto ser llevado a cabo con plasma y no con muestras de sangre entera.

10 La patente de los Estados Unidos 5, 340, 716 describe un método de prueba para determinar la capacidad de coagulación en una muestra de sangre entera en donde la muestra está en contacto con un iniciador de coagulación y una escisión de sustrato péptido unido a una molécula informadora cromogénica, quimioluminiscente o fluorescente. Sin embargo, el método requiere el uso de un dispositivo de prueba sofisticado que comprende una membrana permeable la cual retiene los glóbulos rojos para prevenir la interferencia con una generación o medida de señal.

15 Otro grupo de métodos de prueba son pruebas cromogénicas que miden la actividad enzimática o cofactor de los factores de coagulación. En estas pruebas, se usan péptidos cromogénicos que pueden ser escindidos específicamente por factores de coagulación, por lo tanto liberando una molécula de detección que inhibe la acción del cromóforo, el cual resulta en un cambio de color que puede ser cuantificado fotométricamente. Estos métodos comparten restricciones similares que existen para las pruebas de detección de coágulos, esto es baja sensibilidad e incompatibilidad con muestra de sangre entera. Han sido descritas modificaciones de este protocolo que emplean otras tecnologías de detección (e.g. transferencia de energía resonancia fluorescencia o FRET). No es claro si estos métodos superan las restricciones de las pruebas basados en los conjugados cromóforo/péptido de detención o si estos métodos son efectivos con muestras de pacientes reales, puesto que estos métodos han sido únicamente evaluados con componentes purificados. Adicionalmente, los métodos que involucran FRET presentan dificultades técnicas tales como dificultad en la síntesis de sustrato para FRET, dificultad en espaciar las estructuras donantes y asertoras en FRET que usa secuencias de péptidos, necesarias para volúmenes de muestras más grandes, los problemas asociados con la interferencia, el uso de plasma y no de muestras de sangre entera y así sucesivamente. Otro problema general de las pruebas cromogénicas y FRET descritas anteriormente es que los péptidos usados tienen que ser relativamente cortos. Esto limita la especificidad del factor cognado de la coagulación proteolítica y hace estas pruebas vulnerables a resultados de pruebas errados, puestos que estos péptidos no son solo ascendidos por un factor de coagulación proteolítico sino más bien son susceptibles de de escisión por enzimas proteolíticas múltiples.

Otro método de prueba para detectar perturbaciones de hemostasis se describen en la patente de los Estados Unidos 2003/0027235 y EP 0924523 A2 (Kraus et al) en donde como una consecuencia de la agregación de plaquetas o la reacción de formación de coágulos en una muestra de plasma activada, las sustancias de un sistema de generación de señales son llevadas a una distancia de otra lo cual permite una interacción entre las sustancias lo cual conduce a la generación de una señal medible. Un sistema de generación de señal aplicable en este método para detección de perturbaciones de hemostasis se describe en EP 515194 A2. El sistema comprende un compuesto fotosensibilizador el cual cuando es activado por luz genera un oxígeno singlete y por lo tanto activa un compuesto quimioluminiscente dado que ambos compuestos están en cercana proximidad causada por la presencia de un analito. La D 10 2004 042 124 A1 describe un inmunoensayo mejorado para la determinación de componentes de un sistema de coagulación, particularmente para determinar los marcadores de activación de coagulación, estando el método basado en un sistema de generación de señal descrito en EP 515194 A2.

45 Hay, por lo tanto, una continua necesidad para desarrollar un método de diagnóstico rápido y acertado para establecer la actividad de un factor de coagulación proteolítico de una cascada de coagulación en muestras de pacientes, particularmente reflejando la actividad en vivo, la cual puede estar relacionada con la presencia y/o cantidad y/o actividad de tal factor de coagulación proteolítico. Los métodos deberían ser totalmente automatizados y ser exactos incluso cuando se ejecutan en muestras de sangre entera.

Resumen

50 La presente invención se relaciona con un método para determinar la actividad de un factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación de sangre en una muestra. Una combinación es suministrada en una reacción mixta. La combinación comprende (i) la muestra (ii) un agente de activación para activación directa o indirectamente un factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación de sangre, (iii) una estructura escindida la cual tiene un sitio de escisión que es escindido por el factor de coagulación proteolítico activado, (IV) un agente quimioluminiscente, y (V) un agente sensibilizador. La estructura escindida está o llega a estar enlazada al agente quimioluminiscente y al agente sensibilizador. El agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador están relacionados en que, cuando están en cercana proximidad, la energización del agente sensibilizador resulta en la energización del agente quimioluminiscente. El agente sensibilizador es energizado y siendo generada la señal quimioluminiscente en la mezcla de reacción es

medida y relacionada a la actividad del factor de coagulación proteolítico. La señal quimioluminiscente es inversamente proporcional a la actividad del factor de coagulación proteolítico.

5 En algunas realizaciones la estructura escindida es un sustrato de origen natural del factor de activación del factor de coagulación proteolítico y está presente endógenamente en la muestra, i.e. la estructura escindida es adicionada a la mezcla de adición por reacción de la mezcla a la mezcla de reacción. En estas realizaciones la estructura escindida llega a estar enlazada al agente quimioluminiscente y al agente sensibilizador en la mezcla de reacción.

En algunas realizaciones la estructura escindida está contenida en un reactivo separado el cual es adicionado a la mezcla de reacción. En estas realizaciones la estructura escindida es preferiblemente una entidad sintética, más preferiblemente un péptido.

10 En algunas realizaciones de actividad del factor de coagulación proteolítico activado es indicativo de la presencia y actividad de uno o más componentes de la muestra que va a ser analizada que influencia la actividad del factor de coagulación proteolítico. En algunas realizaciones la mezcla es mezclada con plasma o con sangre entera que es deficiente en un componente individual que influencia la actividad del factor de coagulación proteolítico y la actividad del factor de coagulación proteolítico es indicativo de la presencia o actividad del componente individual en la muestra. En
15 algunas realizaciones la actividad del factor de coagulación proteolítico activado es indicativa de la funcionalidad de la ruta de la coagulación intrínseca o extrínseca de la sangre. En algunas realizaciones la actividad del factor de coagulación proteolítico activado es indicativa de la presencia de uno o más anticoagulantes terapéuticos.

Otra realización de la presente invención es un método para definir una propiedad de activación o propiedad inhibitoria de una sustancia o uno o más factores de coagulación de la cascada de coagulación de la sangre. Se provee una
20 combinación en una mezcla de reacción. La combinación comprende la muestra que contiene uno o más factores de coagulación de la cascada de coagulación de la sangre, una estructura escindida la cual tiene un sitio escindido que es escindido por un factor de coagulación proteolítico activado, un agente quimioluminiscente, un agente sensibilizador y la sustancia que va a ser probada. La estructura escindida está o llega a estar enlazada al agente quimioluminiscente y un agente sensibilizador. El agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador están relacionados por que, cuando están
25 en cercana proximidad, o la energización del agente sensibilizador da como resultado la energización del agente quimioluminiscente. El agente sensibilizador es energizado y la señal de quimioluminiscencia es generada en la mezcla de reacción la cual medida y relacionada con las propiedades de activación o inhibición de la sustancia en una o más factores de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación de sangre. Para evaluar las propiedades de activación o inhibitorias de las sustancias que va a ser probada se mide la señal quimioluminiscente generada en la
30 mezcla de reacción a la cual no se agrega la sustancia que va a ser medida.

BREVE DESCRPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra una realización de los métodos presentes.

La figura 2 es una gráfica que representa resultados a partir de un experimento resumido en la tabla 1.

35 La figura 3 es un diagrama que representa señales generadas con plasmas deficientes en el factor cuando un reactivo PT dispara la ruta extrínseca.

La figura 4 es un diagrama que representa señales generadas con plasmas deficientes en factores cuando un reactivo aPTT dispara la ruta intrínseca.

40 La figura 5 muestra un diagrama que describe señales generadas con un plasma sembrado con el inhibidor directo de la trombina melagatran (diagrama superior) y un diagrama que representa señales generadas con el plasma sembrado con el inhibidor directo de la trombina hirudina (Refludante) (diagrama inferior) cuando la ecarina dispara la activación de la protrombina.

La figura 6 es un diagrama que representa señales generada con diluciones de plasma humano estándar (curva de referencia) cuando la ecarina dispara la activación de la protrombina.

45 El presente método supera muchos problemas asociados con pruebas de coagulación conocidos. Las pruebas de coagulación llevadas a cabo en concordancia con la presente descripción son altamente sensibles. El presente ensayo requiere solo volúmenes de muestra pequeños y, por lo tanto, puede ser llevado a cabo con muestras de sangre entera en oposición a las muestras de plasma que son actualmente usadas. Sin embargo, otro problema asociado con volúmenes altos de muestra, como concentraciones altas de hemoglobina o muestras ictericas o lipahémicas (referidas como una interferencia HIL) son también circundadas mientras mantienen una alta sensibilidad. Adicionalmente, los
50 presentes métodos resuelven los problemas asociados con baja sensibilidad de mucho de los métodos usados actualmente.

Como se mencionó anteriormente, el presente método provee para determinar la actividad de un factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación de sangre en una muestra. La cascada de coagulación de sangre incluye lo descrito anteriormente y rutas intrínsecas y extrínsecas bien conocidas así como la ruta común. Los métodos pueden ser empleados para determinar la actividad (y aquí la presencia y/o la cantidad) de un factor de coagulación proteolítico en una muestra de un sujeto, por ejemplo, una muestra de un paciente. Adicionalmente, el presente método para una técnica de selección general para analizar una muestra por defectos en la ruta extrínseca o intrínseca de la cascada de coagulación de sangre. Teniendo identificada una muestra con un defecto en la ruta intrínseca o extrínseca, e.g. por activación de protrombina trombina directamente usando un agente de activación PT o un aPTT, y determinando o reduciendo o elevando la actividad de la trombina comparada con un control normal, la muestra puede ser analizada en experimentos subsecuentes para determinar los componentes específicos que son defectuosos. Esto puede ser ejecutado mezclando la muestra con plasma o sangre entera deficiente en el componente específico que va a ser probado para una ejecución de los métodos arriba descritos.

La muestra que va a ser analizada puede ser cualquier muestra que se sospecha que contiene al menos uno o más factores de coagulación proteolítico de la cascada de la coagulación de la sangre. La muestra es típicamente de un sujeto mamífero y puede ser plasma o sangre entera. La cantidad de la muestra que va a ser analizada es aproximadamente 0.01 μ l a aproximadamente 50 μ l, o aproximadamente 0.1 μ l a aproximadamente 40 μ l, o aproximadamente 0.5 μ l a aproximadamente 30 μ l, y así sucesivamente. Un sujeto mamífero de interés particular es un sujeto humano aunque otras especies de animales pueden ser también de interés.

Las presentes pruebas son normalmente llevadas a cabo en un medio regulado acuoso con un moderado pH, generalmente el cual suministra sensibilidad óptima en el ensayo. El pH para el medio de ensayo usualmente estaría en el rango de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, más usualmente en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, y preferiblemente del rango de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 9.0. El pH es dependiente de la naturaleza de los componentes de la cascada de coagulación de la sangre, el agente de activación, el enlazante de los miembros enlazantes de cualquier par enlazante específico, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo y así sucesivamente. Diversos reguladores pueden ser usados para alcanzar el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. El regulador ilustrativo incluye borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, HEPES, y similares. El regulador particular empleado no es crítico, pero en un ensayo particular uno u otro regulador pueden ser preferidos. Diversos materiales auxiliares pueden ser empleados en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de los reguladores en el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados, intercambiadores enlazantes, agentes quelantes, preservativos, sales, iones específicos, detergente, reactivos bloqueadores, proteínas, agentes reductores y similares.

La cascada de coagulación de la sangre incluye las rutas intrínseca y extrínseca antes mencionadas así como la ruta común. Así, el término "cascada de coagulación de la sangre" incluye la cascada entera o porciones de la misma. Componentes de la cascada de coagulación de la sangre incluye entidades que están involucradas en las rutas intrínseca, extrínseca y común así como aquellas involucradas en el proceso de hemostasis en general. Los componentes de la cascada de coagulación de la sangre incluye, por ejemplo, factores procoagulantes, por ejemplo, Factor de VonWillebrand (vWF), factores I (fibrinógeno), II (protrombina), IIa (trombina), V, Va, VII, VIIa, VIII, VIIIa, IX, IXa, X, Xa, XI, XIa, XII (Hageman factor), XIIa, factores de tejidos y similares, kalikreina, prekalkreina, HMWK, y así sucesivamente. Los componentes de la cascada de coagulación de la sangre también incluyen factores anticoagulantes e inhibidores de coagulación tales como, por ejemplo, proteína C, proteína S, antitrombina III inhibidores de la serina proteasa C1, TFPI, cofactor 2 heparina, y similares; factores fibrinolíticos y sus inhibidores tales como, por ejemplo, plasminógeno, t-PA, prourokinasa PAI-1, u-PA y similares y así sucesivamente. Los componentes de la cascada de coagulación de la sangre que son primariamente de interés son factores de coagulación proteolíticos. La mayoría de los factores de coagulación son serina proteasas, mientras otros tales como factores V/Va, factor VIII/VIIIa y proteína S son cofactores de proteasas. Otros componentes de la cascada de coagulación de la sangre de interés incluyen proteínas estabilizantes, proteínas transmembrana y cofactores, transglutaminasas y así sucesivamente.

En los presentes métodos, un agente de activación es combinado con las muestras que se sospecha que contienen uno o más factores de coagulación proteolíticos de la cascada de la coagulación de la sangre. El agente de activación es un agente para activación de un componente de la cascada de coagulación de la sangre o para activar la cascada de coagulación de la sangre. La activación directa de un factor de coagulación proteolítico como se discute aquí significa que el agente de activación activa un factor de coagulación proteolítico específico directamente sin depender de la interacción con otros factores que podrían activar o modular el factor de coagulación proteolítico. La activación indirecta de un factor de coagulación proteolítico como se discute aquí significa que el agente de activación activa la cascada de coagulación de la sangre corriente arriba del factor de coagulación proteolítico. La naturaleza del agente activador es dependiente ya sea del agente de activación directa o indirectamente activa un factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación de la sangre, la naturaleza de la prueba que se va a realizar, el componente a ser analizado, la estructura escindida que es usada en la prueba, y así sucesivamente. El agente activador puede ser uno que activa un factor de sangre individual o que activa una ruta tal como la ruta intrínseca o ruta extrínseca. Agentes activadores para activar un componente específico de la cascada de coagulación de la sangre incluyen, por ejemplo, mezclas de o preparaciones que contiene fosfolípidos tales como, por ejemplo fosfolípidos cargados negativamente; lipoproteínas tales como, por ejemplo, tromboplastina, y similares; proteínas o tales como factor de tejido, serina proteasas activada

tales como Factores IIa (trombinas), VIIa, IXa, Xa, XIa, XII, XIIa, y proteínas C, venenos de serpientes tales como enzima PROTAC®, Ecarina, Textarina, Noscara, Batroxobina, Trombocitina veneno de víbora Russell (RVV), y similares. Agentes de activación que activan la cascada de coagulación de sangre o incluye una porción de la misma, por ejemplo, mezclas de o preparaciones que contienen el factor IIa (trombina) fosfolípidos tales como por ejemplo, fosfolípidos cargados negativamente, iones calcio, factor de tejido, activadores específicos tales como sílica, kaolín, ácido eláxico, celita y así sucesivamente. Algunos ejemplos específicos de agentes de activación incluyen, a manera de ilustración y no limitativo, los siguientes: kaolín o ácido eláxico o sílica o celita, fosfolípidos cargados negativamente, iones calcio, lo cuales, cuando se usan en combinación, inician la reacción involucrada en la ruta intrínseca, i.e. la prueba de aPTT; tromboplastina (factor de tejido), fosfolípidos cargados negativamente e iones calcio, los cuales, cuando se usan en combinación, inician la reacción involucrada en la ruta extrínseca, esto es la prueba de PT.

La cantidad del agente activador es la que es suficiente para activar el componente de la cascada de coagulación de sangre o la cascada de coagulación de la sangre por sí misma. La cantidad depende de la naturaleza del factor de coagulación proteolítico que va a ser activado, la naturaleza de la cascada de coagulación de la sangre, la naturaleza del método de prueba que va a ser llevado a cabo, la escala de la reacción de prueba, y así sucesivamente. Así, la cantidad particular del agente de activación empleado en un método en concordancia con la presente realización se determina desde una consideración de los factores anteriores y puede ser determinada empíricamente.

El paso de activación puede requerir un periodo de incubación de longitud suficiente para alcanzar un nivel de activación tal que una determinación pueda hacerse a partir de la actividad del factor de coagulación proteolítico. La duración y otras condiciones del periodo de incubación dependen de la naturaleza del agente activador, la naturaleza del componente que va a ser activado, la naturaleza de la cascada de coagulación de la sangre, la naturaleza de la prueba que va a ser llevada a cabo, y así sucesivamente. Así, la duración y otras condiciones en un método particular en concordancia con la presente realización se determinan desde una consideración de los factores anteriores y puede ser determinada empíricamente. La activación puede requerir materiales adicionales que trabajan en concierto con el agente de activación. Tales materiales adicionales incluyen, por ejemplo, proteínas, reguladores, sales, detergentes, iones, agentes reductores, agentes quelantes, y así sucesivamente.

En el presente método los agentes empleados para determinar la actividad de un factor de coagulación proteolítico o para determinar la actividad, presencia y/o la cantidad del componente de la cascada de coagulación sanguínea. Los agentes comprenden tres entidades: una estructura escindida en donde la estructura escindida tiene un sitio escindido que es escindido por un factor de coagulación proteolítico activado, un agente quimioluminiscente y un agente sensibilizador. El agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador están relacionados en que, cuando están en cercana proximidad, la energización del agente sensibilizador da como resultado energizar el agente quimioluminiscente.

La estructura escindida es cualquier estructura, cuya escisión puede estar relacionada a la actividad del factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación sanguínea. Así, la naturaleza de la estructura de escisión es dependiente de la naturaleza del factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación sanguínea que se va a determinar. La estructura escindida puede ser un material sintético o un material de origen natural. La estructura escindida tiene un sitio escindido que es escindido por un factor de coagulación proteolítico donde la escisión del sitio escindido está directamente relacionado con la presencia de actividad del factor de coagulación proteolítico específico. La estructura escindida comprende un medio para enlazar la estructura escindida al agente quimioluminiscente y para enlazar la estructura escindida al agente sensibilizador.

En algunas realizaciones la estructura escindida es una entidad sintética que es adicionada a la mezcla de reacción. En algunas realizaciones al menos el sitio escindido de la estructura escindida es un péptido, esto es, el sitio escindido está compuesto primariamente de aminoácidos. La estructura escindida completa puede ser un péptido en donde una porción del péptido comprende un sitio escindido. Así, la estructura escindida puede ser parcialmente o únicamente peptídica. De otro lado un sitio escindido que es un péptido puede ser parte de una estructura escindida que comprende o no una cadena no peptídica en donde la cadena no peptídica comprende a miembros no aminoácidos, los cuales podrían proveer unión a otra entidad tal como por ejemplo, a una partícula, miembros de un par enlazante específico, y similares. Un sitio escindido peptídico podría estar presente en cualquier posición dentro de una cadena peptídica o no peptídica siendo la consideración primaria que la escisión del sitio escindido da como resultado que el reactivo quimioluminiscente y el reactivo sensibilizador no están en cercana proximidad. La longitud de un sitio escindido que es un péptido es al menos aproximadamente 3 unidades monoméricas (usualmente, unidades de aminoácidos) y no más de aproximadamente 150 unidades monoméricas, o al menos 15 unidades monoméricas y no más de aproximadamente 130 unidades monoméricas. La longitud de una cadena de átomos en una cadena no peptídica, que incluyen el sitio escindido peptídico podría ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 5000 átomos. La longitud de una cadena en una cadena peptídica, que incluye el sitio escindido peptídico, podría ser aproximadamente 5 a aproximadamente 5000 unidades monoméricas.

El término "al menos" tal como se usa aquí significa que el número de ítems especificados podría ser igual a o mayor que el número citado. La frase "aproximadamente" tal como se usa aquí significa que el número citado podría diferir por

más o menos 10%; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un rango de 4.5 a 5.5.

5 La estructura escindida podría por si misma ser un componente de cascada de coagulación sanguínea, un factor de coagulación o una porción del mismo que está presente endógenamente en una muestra o es adicionado como un reactivo separado. Ejemplos de tales estructuras escindidas, a manera de ilustración y no limitación incluyen estructuras presentes en o consistentes del Factor V el cual es específicamente escindido por la proteína C activada, Factor Xa, Trombina o plasmina; el fibrinógeno, el cual es específicamente escindido por trombina; el factor II (protrombina), el cual es escindido por el factor IIa (trombina) Factor Xa, o algunos venenos de serpientes tales como Ecarina o Textarina; el Factor V el cual es escindido por trombina o Factor Xa; el Factor VII, el cual es escindido por trombina o Factores VIIa, IXa, Xa, XIIa, respectivamente; el Factor VIII, el cual es escindido por trombina; el Factor IX el cual es escindido por el Factor VIIa o Factor XIIa; el Factor X, el cual es escindido por Factor XIIa o Factor IXa o veneno de serpiente tal como RVV; el Factor XI, el cual es escindido por Factor XIIa, trombina o Factor XIIa, el cual es escindido por el Factor XIIa, kalikreína, plasmina o tripsina; el Factor XIII el cual es escindido por trombina, la proteína S la cual es escindida por trombina y así sucesivamente.

15 En general la longitud de la estructura escindida depende de los requerimientos de la secuencia del factor de coagulación proteolítico que va a ser determinado y de la naturaleza del agente quimioluminiscente y del agente sensibilizador, y similares. La longitud es tal que hay una diferencia medible significativa en la señal producida por la energización del agente quimioluminiscente por el agente sensibilizador cuando los dos agentes están en proximidad cercana (esto es, enlazados juntos por la estructura escindida) así comparada con la señal obtenida cuando el agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador no están en proximidad cercana (esto es, no enlazados juntos por la estructura escindida). Estos agentes se discuten en detalle más abajo.

20 La energización del agente quimioluminiscente por el agente sensibilizador toma lugar cuando los dos agentes están en cercana proximidad, esto es, por ejemplo, en un rango de distancia de unos pocos micrómetros, en particular dentro de un rango de distancia de menor de 600 nm preferiblemente menor de 200 nm.

25 En la mezcla de reacción, la estructura escindida está o llega a estar enlazada al agente quimioluminiscente y al agente sensibilizador. Hay diversas metodologías en las cuales pueden ser empleados los agentes, las cuales se resumen aquí y se discuten en detalle más abajo. En una metodología, la estructura escindida y la muestra que va a ser analizada son combinadas donde la estructura de escisión está ya sea contenida en un reactivo separado el cual es adicionado a la mezcla de reacción o a la estructura escindida que es un sustrato natural del factor de coagulación proteolítico el cual está contenido en la muestra. El agente quimioluminiscente se adiciona después de la activación de los componentes de la cascada de coagulación sanguínea. Entonces, se adiciona el reactivo sensibilizador. Alternativamente, el agente quimioluminiscente y la estructura escindida (como un reactivo individual con la estructura escindida unida al agente quimioluminiscente o como dos reactivos en donde la estructura escindida llega a estar unida al agente quimioluminiscente in situ, esto es, en la mezcla de reacción) puede ser combinada con la muestra que va a ser analizada y el factor de coagulación sanguínea proteolítico puede entonces ser activado seguido por la adición del agente sensibilizador. En otra aproximación, el agente sensibilizador y la estructura escindida (como un reactivo individual con la estructura escindida unida al agente sensibilizador o como dos reactivos en donde la estructura escindida llega a estar unida al agente sensibilizador in situ) puede ser combinada con la muestra que va a ser analizada y el factor de coagulación proteolítico puede entonces ser activado seguido por la adición del agente quimioluminiscente. En otro método, el agente quimioluminiscente el agente sensibilizador y la estructura escindida (como un reactivo individual con la estructura escindida unida tanto al agente quimioluminiscente y al agente sensibilizador (preformado) o como tres reactivos en donde la estructura escindida llega a estar unida al agente quimioluminiscente y al agente sensibilizador in situ) puede ser combinada con la muestra que va a ser analizada y puede entonces ser activado el factor de coagulación sanguínea proteolítico.

45 En algunas realizaciones la estructura escindida está combinada con la muestra que va a ser analizada, la combinación es incubada por un tiempo y bajo condiciones tales que la estructura escindible es escindida si la muestra contiene un factor de coagulación proteolítico bajo análisis (esto es después de la activación). La estructura escindible comprende un medio para enlazar la estructura escindible al agente quimioluminiscente y para enlazar la estructura escindible al agente sensibilizador. Así, después del periodo de incubación, el agente quimioluminiscente se agrega a la combinación y se enlaza a esa estructura escindible o, si la estructura escindible es escindida a una porción de estructura escindible, la cual comprende los medios para enlazar la estructura escindible y el agente quimioluminiscente. La metodología en donde la estructura escindible y el agente quimioluminiscente son adicionados separadamente permite fácil selección de diversas estructuras escindibles diferentes para usos en los presentes métodos, y puede permitir mejor accesibilidad estérica de la proteasa activada de la estructura de escisión.

55 Los medios para enlazar la estructura escindible y el agente quimioluminiscente pueden incluir miembros de un par enlazante específico. Un miembro del par enlazante específico está enlazado a la estructura escindible y el otro miembro del par enlazante específico está unido al agente quimioluminiscente. Un miembro de un par enlazante específico ("miembro sbp") es una de las dos moléculas diferentes, que tienen un área en la superficie o en una cavidad, la cual se enlaza específicamente y está por lo tanto definida como complementaria con una organización espacial y

5 polar particular de otra molécula. Los miembros del par enlazante específico pueden ser miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo (que incluyen anticuerpos monoclonales) aunque otros pares enlazantes específicos tales como biotina-(estrept)avidina, hormonas- hormonas receptores, enzima-sustrato, dúplex de ácido nucleico e IgG- proteína A, pares polinucleotidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, y similares no son pares inmunológicos pero están incluidos dentro del alcance del miembro sbp.

10 En algunas realizaciones los medios para enlazar la estructura escindible o una porción del mismo agente quimioluminiscente pueden involucrar un antígeno o sitio epitópico en la estructura escindible y en el miembro sbp sobre el agente quimioluminiscente en donde el miembro sbp se dirige contra el antígeno o sitio epitópico. Un miembro sbp para el sitio epitópico o antigénico puede estar presente del agente quimioluminiscente por un enlace covalente tal como por enlace covalente del miembro sbp al agente quimioluminiscente. Por otro lado el enlace del miembro sbp para la estructura escindida del agente sensibilizador puede ser logrado por el uso de un miembro par sbp diferente tal como, por ejemplo, un anticuerpo dirigido al sitio epitópico de la estructura escindible enlazada a la biotina en donde el agente sensibilizador comprende un asociado enlazante para la biotina tal como antibiótico o estreptavidina.

15 En algunas realizaciones la muestra es combinada con una estructura escindible, la cual está ya enlazada al agente quimioluminiscente. En este método la estructura escindible puede estar enlazada al agente quimioluminiscente por enlace covalente o no covalente. Ejemplos de enlaces no covalentes del uso de un miembro par sbp como se discutieron más arriba.

20 En alguna realización las estructura escindible y el agente quimioluminiscente pueden estar unidos covalentemente. El enlace puede ser por un enlace directo o a través de un grupo enlazante en donde la estructura escindible y el agente quimioluminiscente están acoplados entre sí por medio de uno o más enlaces covalentes. El proceso de enlace covalente puede estar comprendido de cualquier número de pasos. El grupo enlazante que se une a la estructura escindible y al agente quimioluminiscente pueden comprender uno o más funcionalidades para enlazar. Las funcionalidades enlazantes pueden comprender átomos diferentes al hidrógeno seleccionados del grupo normalmente que consiste de carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. Los grupos enlazantes pueden ser alifáticos o aromáticos. Cuando están presentes heteroátomos, el oxígeno está normalmente presente como oxo u oxi, enlazado al carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno está presente normalmente como nitro, nitroso o amino, normalmente enlazado al carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre es análogo al oxígeno; mientras el fósforo está enlazado al carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, usualmente como fosfonato o fosfato mono-o diéster. Funcionalidades comunes en la formación de un enlace covalente entre la estructura escindible y el agente quimioluminiscente incluye alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato y ésteres de fosfato, amidas y tioésteres. Varios grupos enlazantes son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245: 3059. Grupos enlazantes específicos y útiles en componentes enlazantes incluyen ácidos bicarboxílicos y anhídridos, poliamidas, polialdehídos, y agentes heterobifuncionales tales como 2-iminotiolano clorhidrato, sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidometil) ciclohexano- 1-carboxilato, m-maleimidossuccinimida éster, N-succinimidil-(4-iodoacetil) aminobenzoato, y especies similares conocidas de aquellos expertos en la técnica.

35 La longitud del grupo enlazante que enlaza la estructura escindible y el agente quimioluminiscente es dependiente en las consideraciones discutidas más arriba con respecto a la longitud de la estructura escindible. El grupo enlazante puede ser visto como parte de la estructura escindible con respecto a las consideraciones globales de la longitud o distancia entre el agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador.

40 Después de la activación del factor de coagulación proteolítico o después de la activación de la cascada de coagulación sanguínea, si el agente quimioluminiscente no está ya incluido en la combinación ya sea unido a la estructura escindible o como un reactivo separado, el cual comprende medios para unirse a la estructura escindible, el agente quimioluminiscente es adicionado a la combinación. Así, como se discutió más arriba, el agente quimioluminiscente puede ser adicionado antes de o subsecuente a la activación del factor de coagulación proteolítico o de la cascada de coagulación sanguínea.

45 Como se mencionó más arriba, los agentes empleados en los métodos de la presente invención también comprenden un agente sensibilizador que es capaz de unirse a la estructura escindible o una porción de la misma. Así, la estructura escindible incluye medios para enlazarse al agente sensibilizador. Tales medios incluyen interacción de medios sbp como se discutió anteriormente con respecto al agente quimioluminiscente unido a la estructura escindible. En general, los medios para unir el agente quimioluminiscente y los medios para unir el agente sensibilizador a la estructura escindible están en sitios opuestos del sitio de escisión de la estructura escindible. Por lados opuestos se entiende que la escisión del sitio de escisión por el factor de coagulación proteolítico resulta finalmente en una porción separada de la estructura escindible que comprende el agente quimioluminiscente y una porción separada de la estructura escindible que comprende el agente sensibilizador, el cual por lo tanto retira el agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador lo retira de la proximidad cercana y no permite que el agente quimioluminiscente y el sensibilizador estén en proximidad cercana.

En algunas realizaciones los medios para unir la estructura escindible o una porción de la misma al agente

sensibilizador pueden involucrar un sitio antigénico o epitópico en la estructura escindible y un miembro sbp del reactivo sensibilizado en donde el miembro sbp es dirigido contra el sitio antigénico y epitópico. Un miembro sbp para el sitio antigénico o epitópico puede estar presente en el agente sensibilizador por enlace covalente tal como mediante enlace covalente al miembro sbp al agente sensibilizador. Por otro lado, el enlace al miembro sbp de la estructura escindible al agente sensibilizador puede ser lograda por el uso de un par de miembros sbp diferentes tales como, por ejemplo, un anticuerpo dirigido al sitio epitópico de la estructura escindible enlazada a la biotina en donde el agente sensibilizador comprende un asociado enlazante a la biotina tal como antibiótico o estreptavidina.

El agente sensibilizador puede ser cualquier estructura que por activación produce un producto que activa la composición quimioluminiscente, la cual a su vez genera una señal detectable.

En muchas realizaciones el sensibilizador es capaz de generar oxígeno singlete por activación. En muchas realizaciones el sensibilizador es un fotosensibilizador por generación de un oxígeno singlete o usualmente por excitación con la luz. El fotosensibilizador incluye aquellas entidades que pueden ser fotoactivadas (por ejemplo, colorantes y compuestos aromáticos) o quimioactivados (por ejemplo enzimas y sales metálicas). El fotosensibilizador debería absorber luz en el rango de longitud de onda de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000nm o aproximadamente 300 a aproximadamente 1000nm o aproximadamente 450 a aproximadamente 950nm con un coeficiente de extinción en su máxima observancia mayor que aproximadamente $500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o al menos aproximadamente a $5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o al menos aproximadamente $50,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en la longitud de onda de excitación. Los fotosensibilizadores que son excitados por la luz serán relativamente fotoestables y no reaccionarán eficientemente con oxígeno singlete.

Varios aspectos estructurales están presentes en la mayor parte de fotosensibilizadores útiles. La mayoría de los fotosensibilizadores que son excitados por la luz tienen al menos 1, o frecuentemente tres o más enlaces dobles o triples enlaces conjugados mantenidos frecuentemente en una estructura aromática rígida. Esto puede contener al menos un grupo que acelere el cruzamiento intersistema tal como un grupo carbonilo o imina o un átomo pesado seleccionado de las filas 3-6 de la tabla periódica, especialmente yodo o bromo, o esto podría estar extendido a las estructuras aromáticas. Los fotosensibilizadores típicos incluyen acetona, benzofenona, 9- tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metalo-porfirinas, tales como hematoporfirina, ftalocianinas, clorofilas, rosa de bengala, buckminsterfulereno, etc, y derivados de estos compuestos que tienen sustituyentes para hacer tales compuestos más liopofílicos o más hidrofílicos y/o como grupos enlazantes para unirse, por ejemplo, a un miembro sbp. Ejemplos de otros fotosensibilizadores que podrían ser utilizados son aquellos definidos en la patente de los Estados Unidos No 5, 340,716 y 6, 153,442.

El agente quimioluminiscente comprende un compuesto que sufre una reacción química por excitación directa o sensibilizada por luz o por reacción con oxígeno singlete o por activación química para formar un producto de reacción metaestable que es capaz de descomponerse con emisión simultánea o subsecuente de luz, usualmente dentro del rango de longitud de onda de aproximadamente 250 a aproximadamente 1200 nm. En algunas realizaciones la composición quimioluminiscente comprende una sustancia que reacciona con oxígeno singlete para formar dioxietanos o dioxietanonas. Estas últimas son usualmente olefinas ricas en electrones. Ejemplo de tales olefinas ricas en electrones son éteres enaminas, 9-alkiliden-N-alkilacridanos, arilviniléteres, dioxenos, arilimidazoles, 9-alkilidene-xantanos, 2,3-dihydro-1,4-phthalazinediones, 2, 4,5-trifenil-imidazol, y similares. Otros compuestos incluyen luminol y otras ftalhidrazidas y compuestos quimioluminiscentes que están protegidos de sufrir una reacción quimioluminiscente en virtud de estar protegidos por un grupo protector lábil fotoquímico, tales compuestos incluyen, por ejemplo, luciferina de luciérnaga, acuaforina, y similares.

Los compuestos quimioluminiscentes preferiblemente emiten una longitud de onda por encima de 300 nm, preferiblemente por encima de 500 nm y más preferiblemente por encima de 550 nm. Compuestos que absorben y emiten luz a longitudes de onda más allá de la región en donde los componentes de la muestra contribuyen significativamente a la absorción son de uso particular en realizaciones de los presentes métodos. Las olefinas ricas en electrones generalmente tienen un grupo donante de electrones en conjugación con la olefina. Las olefinas más preferidas son aquellas como un dioxietano que cae rápidamente a temperatura ambiente (menos de 60 minutos, preferiblemente menos de 5 minutos, deseables menos de 30 seg). Los doxietanos pueden ser luminiscentes solos o en conjunción con un aceptor de energía fluorescente.

Otros compuestos quimioluminiscentes incluyen fruíoróforos tales como, por ejemplo, rodaminas, bromuro de etidio, 5-dimetilamino-1-naftalenesulfonilo, quelatos de europio (Eu) con el agente 3-(2-tienoil)-1, 1,1-trifluoroacetona (TTA) (Eu (TTA) 3) o quelatos de rutenio (Ru) con el agente 2,2'-dipiridilo (byp) (Ru (bpy)3). Ejemplo de otros compuestos quimioluminiscentes son aquellos definidos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 340,716 and 6, 153,442.

En muchas realizaciones el agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador están cada uno asociado con un soporte. Como se usa aquí la frase, "asociado con" incluye enlaces covalentes de una estructura a otra estructura ya sea por un enlace directo o a través de un grupo enlazante, enlace no covalente de una estructura a otra estructura ya sea directamente o por medio de miembros de pares específicos de enlazamiento enlazados a las estructuras,

incorporación de una estructura en otra estructura tal como por disolución de una estructura en otra estructura o por síntesis recubriendo una estructura en otra estructura y así sucesivamente.

5 El soporte puede estar comprendido de un material insoluble en agua orgánico o inorgánico, sólido o fluido, el cual puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de un número de formas, tal como en partículas que incluye perlas y partículas, película, membrana, tubo, pozos, bandas, barras, superficies planas tales como por ejemplo placas y similares. En muchas realizaciones el soporte está suspendido en el medio en el cual es empleado. Ejemplo de los soportes suspendidos son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, aceites en gotas, celdas e hidrogeles, partículas magnéticas y similares. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli (vinil cloruro), poliacrilamida, poliacrilato, 10 polietileno, polipropileno, poli (4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli (etilen tereftalato), nylon, poli(vinyl butirato), etc; ya sea usado por ellos mismos o en conjunción con otros materiales.

15 En algunas realizaciones las partículas son empleadas como soporte. Las partículas pueden tener un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0.02 micrones y no más de aproximadamente 100 micrones. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio desde aproximadamente 0.05 micrones a aproximadamente 20 micrones está desde aproximadamente 0.02 micrones a aproximadamente 10 micrones. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, sólida o que contenga un vacío interno, preferiblemente de una densidad que se aproxima a la del agua, generalmente desde aproximadamente 0.7 g/mL a aproximadamente 1.5 g/mL, y compuesta de material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, 20 leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, estafilococos aureus, E. coli, virus, y similares. Las partículas pueden también ser partículas comprendidas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas fosfolipídicas, quilomicrones, lipoproteínas, y similares. En algunas realizaciones, las partículas, son partículas de látex.

25 Las partículas de polímero pueden estar formadas por adición de condensación de polímeros. Las partículas serán fácilmente dispersables en un medio acuoso y pueden ser adsorbente o funcionalizables de forma que permita la conjugación con un miembro sbp o un compuesto quimioluminiscente o un compuesto sensibilizador ya sea directa o indirectamente a través de un grupo enlazante. Las partículas pueden también ser derivadas de materiales de origen natural, materiales de origen natural que son modificados sintéticamente, y materiales sintéticos. Entre los polímeros orgánicos de partículas de interés están polisacáridos, particularmente polisacáridos entrecruzados tales como agarosas, la cual es disponibles como sefarosa, dextrano, disponible como Sefadex y Sefacril, celulosa, almidón y similares; adición de polímeros tales como poliestireno, polivinil alcohol homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y aminas que tienen funcionalidades hidroxilo libres y similares. 30

35 Un compuesto quimioluminiscente y/o un compuesto sensibilizador pueden estar asociados con un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica. En algunas realizaciones, los compuestos están disueltos en el soporte sólido o en una capa en el soporte sólido. En algunas realizaciones, el compuesto puede estar recubierto por un enlace covalente directamente a la fase sólida o puede tener capas de uno o más moléculas transportadoras tales como poli "aminoácidos" que incluyen proteínas tales como seroalbúminas o inmunoglobulinas, o polisacáridos (carbohidratos) tales como, por ejemplo, dextrano o derivados de dextrano o aldehídos o dialdehídos, y así sucesivamente. Grupos enlazantes pueden también ser usados para enlazar covalentemente el soporte sólido y el compuesto. Otros métodos de enlazamiento de los compuestos son también posibles. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un enlazador para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, (estrept)avidina, un anticuerpo, etc, y una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina, hapteno, etc., puede estar enlazado al compuesto o viceversa. El enlazamiento de los compuestos a la superficie de un soporte puede ser directo indirecto covalente o no covalente y puede lograrse por técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la literatura. Véase, por ejemplo, Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 40 245: 3059 (1970). 45

Las concentraciones de varios reactivos del sistema de reactivos generalmente serán determinadas por el rango de concentración de interés de los componentes de la cascada de coagulación sanguínea y similar. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad de los ensayos sobre el rango de interés. Esto es, una concentración de variación del analito que es de significado debe proveer una diferencia de señal medible exacta. Consideraciones tales como la naturaleza de los agentes que se van a emplear y la naturaleza de los componentes de la cascada de coagulación sanguínea normalmente determina la concentración de varios reactivos. 50

La función de los agentes que se van a emplear es ayudar en el análisis para la actividad del factor de coagulación proteolítica, el cual puede estar relacionado con la determinación de la presencia y/o cantidad y/o actividad de uno o más componentes de la cascada de coagulación sanguínea. Como se mencionó anteriormente, el efecto de la activación directa o indirecta del factor de coagulación proteolítico sobre los agentes se evalúa para determinar la actividad del factor de coagulación proteolítico, el cual puede estar relacionado con la presencia y/o cantidad y/o actividad de otro factor de coagulación proteolítico o un cofactor. Si uno o más de los componentes de la cascada de 55

- coagulación sanguínea que influencia la actividad del factor de coagulación proteolítico no está presente o no es activado, la escisión de la estructura escindible es ya sea inhibida o activada dependiendo de la naturaleza del cofactor de influencia en la actividad del factor de coagulación proteolítico. La mezcla de reacción que contiene la combinación comprende el agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador enlazados en diferentes lados del sitio escindido de la estructura escindible. La señal obtenida con la muestra desconocida se compara con la obtenida con la muestra conocida que va a carecer del componente de la cascada de coagulación sanguínea (control) y la diferencia en la cantidad de señal se relaciona con la presencia y/o cantidad y/o actividad del componente en la muestra desconocida. Para la mayoría la cantidad de señal del compuesto quimioluminiscente es inversamente proporcional a la actividad de escisión del factor de coagulación proteolítico activado.
- 5
- 10 Después de la adición de los reactivos de sistema de reactivos a la mezcla de reacción y después del apropiado periodo de incubación según sea necesario para el escindido del sitio escindido y otros procesos, la mezcla de reacción es tratada para energizar el agente sensibilizador. La energización del agente sensibilizador depende de la naturaleza del sensibilizador. La energización del agente sensibilizador puede ser por aplicación de luz, calor, agentes químicos y así sucesivamente. Para un agente sensibilizador que es activado por luz, la mezcla de reacción se irradiada con luz.
- 15 Determinación de los factores de coagulación proteolítica o componentes de la cascada de coagulación sanguínea se refieren a la detección cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa de los componentes de la actividad de los componentes. Los métodos de determinación de los componentes pueden ser cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, los términos "detección" y "medición", así como otros sinónimos comunes para medición son contemplados dentro del alcance de la presente invención.
- 20 La determinación de un factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación de sangre involucra la detección de una señal desde la mezcla de reacción que comprende la combinación de los reactivos y la muestra antes mencionada. La presencia y/o cantidad de la señal están relacionadas con la presencia y/o cantidad y/o actividad de los componentes en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sensibilizador y de los agentes quimioluminiscentes. Como se mencionó anteriormente, en muchas realizaciones la cantidad de la señal del compuesto quimioluminiscente es inversamente proporcional a la actividad de escisión de un factor de coagulación proteolítico activado.
- 25
- 30 El examen para la presencia y/o cantidad de las señales incluye la detección de la señal, la cual es generalmente un paso en el cual la señal es leída. La señal es normalmente leída usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrometrías de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, actinómetro, instrumento fotográfico y similar. La presencia y señal detectada está relacionada con la presencia cantidad y actividad de los componentes presentes en la muestra. La temperatura durante la medición generalmente está en el rango desde aproximadamente 10°C a aproximadamente 70°C, o desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, o aproximadamente 20° C a aproximadamente 25°C. En una metodología las curvas estándar se forman usando concentraciones conocidas de los componentes que van a ser
- 35 analizados. Como se discutió anteriormente, pueden usarse también calibradores y otros controles.
- 40 Cuando se usa un agente fotosensibilizador, el fotosensibilizador sirve para activar el agente quimioluminiscente cuando se irradiada la mezcla de reacción contiene los reactivos arriba mencionados. La mezcla de reacción se irradia con luz que tiene una longitud de onda de suficiente energía para convertir el fotosensibilizador en un estado excitado y hacer posible que se active el oxígeno molecular a oxígeno singlete. La concentración del agente fotosensibilizador puede ser bajo, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-12} M o menor. Generalmente, para las realizaciones arriba mencionadas que involucran un agente fotosensibilizador, la mezcla de reacción se irradia con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 300 a 1200 nm, o aproximadamente 450 a aproximadamente 950, o aproximadamente 550 a aproximadamente 800 nm. La señal resultante es medida a una longitud de onda de aproximadamente 550 a aproximadamente 800 nm, aproximadamente 600 a aproximadamente 700 nm, o en algunas realizaciones a aproximadamente 612 nm. La cantidad de esta señal se relaciona a la presencia y/o cantidad y/o actividad de los componentes de la cascada de coagulación sanguínea en la muestra.
- 45
- 50 El periodo de irradiación dependerá del tiempo de vida del agente quimioluminiscente activado, de la intensidad de luz y de la intensidad de emisión deseada. Para agentes quimioluminiscentes activados de corta vida, el periodo puede ser menor de un segundo, usualmente aproximadamente un milisegundo pero podría ser tan corto como un microsegundo en donde se usa una lámpara de destello intenso o láser. Para agentes quimioluminiscentes activados de larga vida, el periodo de irradiación puede ser más largo y menos intenso puede usarse una fuente de luz estable. En general, la intensidad de la luz integrada sobre el periodo de irradiación debe ser suficiente para excitar al menos 0,1% de las moléculas fotosensibilizadoras, preferiblemente al menos 30%, y más preferiblemente, cada molécula fotosensibilizadora será excitada al menos una vez.
- 55 La luminiscencia o luz producida en cualquiera de los métodos anteriores puede ser medida visualmente, fotográficamente, actinométricamente, espectrofotométricamente o por cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad del mismo, la cual está relacionada a la cantidad de analito en el medio.

Una láser helio-neón es una fuente de luz de bajo coste para excitación a 632.6 nm. Los fotosensibilizadores que absorben luz en esta longitud de onda son compatibles con la línea de emisión del láser helio-neón y son, por lo tanto, particularmente útiles en los métodos presentes en la cual se emplea el fotosensibilizador. Otras fuentes de luz incluyen, por ejemplo, otros láser tales como Argón, YAG, He/Cd, y rubí; fotodiodos, mercurio, sodio y lámparas de vapor de xenón; lámparas incandescentes tales como tungsteno/halógeno; y lámparas de destello.

Realizaciones específicas para pruebas

Las siguientes realizaciones específicas de los métodos para analizar uno o más componentes de la cascada de coagulación sanguínea son provistas para propósitos de ilustración y no limitación.

En una realización del presente método (refiriéndose a la Figura 1), la estructura escindible es un péptido que contienen un epítipo en un extremo y una molécula de biotina (B) en el otro extremo. El péptido contiene un sitio escindido para una de las serina proteasas entre los factores de coagulación. El péptido se incubaba con una muestra de un paciente, la cual es una muestra de sangre o muestra de plasma. (El péptido puede también estar directamente conjugado al agente quimioluminiscente, en cuyo caso no se requiere el par no epitópico enlazante). La coagulación es entonces disparada por activadores de las rutas extrínseca o intrínseca o factores individuales (por ejemplo, Batroxobin). Un factor de coagulación que es ya sea directa o indirectamente activado puede entonces escindir el péptido. Después de la escisión, se adiciona un agente quimioluminiscente si el péptido no está directamente conjugado al agente quimioluminiscente. El agente quimioluminiscente es una partícula en la cual se disuelve un compuesto quimioluminiscente (Chemibead); la superficie que está recubierta con un anticuerpo con un epítipo del péptido el cual está localizado en un lado del sitio escindido. El agente sensibilizador se adiciona al medio. El agente sensibilizador es una partícula en la cual se disuelve un fotosensibilizador y la superficie a la cual está unido un asociado enlazante, tal como estreptavidina, para la marca de biotina (B) del péptido el cual está localizado al lado opuesto del sitio escindido. El medio se irradia a 680 nm para energizar el fotosensibilizador. La señal resultante es inversamente proporcional a la actividad del factor de coagulación respectivo porque una señal fuerte (agente quimioluminiscente y agente fotosensibilizador están en una proximidad cercana) indica que el péptido no está escindido, indicando aquí la ausencia de un factor activado, en donde una señal débil (agente quimioluminiscente y agente fotosensibilizador no están en proximidad cercana) indica que el péptido está escindido indicando aquí la presencia o actividad de un factor de coagulación proteolítico activado. La señal se determina ya sea por concentración o actividad bioquímica del factor mismo (si el factor es activado directamente) o si las concentraciones de las actividades bioquímicas de uno o más componentes que influyen la actividad del factor de coagulación proteolítico específico, esto es factor de coagulación corriente arriba de la cascada de coagulación sanguínea (si la ruta o factor de coagulación que actúa corriente arriba del factor de coagulación proteolítico específico es activado. Las actividades bioquímicas de los factores de coagulación de la cascada de coagulación sanguínea pueden ser influenciadas por alteraciones genéticas, inhibiciones de síntesis adquiridas, agentes terapéuticos, anticuerpos inhibitorios, defectos en cofactores requeridos y así sucesivamente, lo cual lleva al método descrito a ser usado tanto para diagnóstico como para monitorización de terapia. En una realización preferida del presente método, la actividad del factor de coagulación proteolítico activado es indicativa de la presencia y/o cantidad de uno o más anticoagulantes terapéuticos en una muestra de un paciente. El método presente lleva por ejemplo a la determinación de los inhibidores de trombina directa, tales como, por ejemplo, hirudina, argatroban o melagatran por combinación de una muestra de un paciente con un agente de activación el cual activa la protrombina, como por ejemplo Ecarina y con una estructura escindida. Cuya escisión puede estar relacionada con la actividad de un producto proteolíticamente activo o protrombina activada, tal como meizotrombina o trombina. Si un inhibidor directo de trombina está presente en la muestra, se inhibe la actividad de un producto activado proteolíticamente de protrombina activada y se reduce la escisión de la estructura escindida.

En otra realización del presente método, pueden determinarse la actividad tanto de la serina proteasa y no serina proteasa como los factores de coagulación. El péptido (por ejemplo, con un Factor Xa o sitio ascendido específico trombina) es correspondiente a una serina proteasa que está corriente abajo (en la cascada de coagulación sanguínea) si el factor de coagulación que es cuantificado en la ruta respectiva. El péptido es primero incubado con un plasma o una muestra de sangre completa que es deficiente en el factor de coagulación el cual va a ser cuantificado, más la muestra del paciente que contiene una cantidad desconocida de un factor de coagulación que va a ser cuantificado. La coagulación es entonces disparada por activadores de las rutas extrínseca o intrínseca, o un factor individual (por ejemplo Veneno de Víbora Russel, RVV). La ruta de coagulación respectiva puede ser solamente activada si el factor de coagulación que va a ser cuantificado está presente en la muestra del paciente, y la cantidad de activación es directamente proporcional a la actividad bioquímica del factor de coagulación respectivo de la muestra del paciente. Después de la escisión del péptido, se adiciona Chemibeads (como se describió anteriormente) recubierto con un anticuerpo contra el epítipo del péptido, si los péptidos reportados no son directamente conjugados al Chemibeads. Se adicionan subsecuentemente Sensibeads (como se describió anteriormente) si no se adiciona directamente al Chemibeads y el medio se irradia con luz a una longitud de onda de 680 nm. La señal resultante es medida y relacionada con el factor de coagulación que va a ser cuantificado.

Pruebas de diagnóstico iniciales de pacientes de los cuales se sospechan desórdenes de sangrado es usualmente

llevado a cabo con la llamada prueba de coagulación global, de aPTT Y de PT. Además, estas pruebas son también usadas para monitorización de terapias anticoagulantes. Mientras que el aPTT es principalmente usado para la detección de deficiencias en factores de la ruta intrínseca y para terapia de monitorización de terapia de heparina, el PT es usado para detección de deficiencias en factores de la ruta extrínseca y para monitorización de terapia de antagonistas de vitamina K. Tanto el aPTT Y el PT pueden también ser usados para la detección de deficiencias en factores individuales mezclando un plasma que es deficiente en el factor de coagulación que va a ser cuantificado, más una muestra de un paciente que contenga una cantidad desconocida de un factor de coagulación que va a ser cuantificado. En concordancia, la realizaciones de los presentes métodos pueden ser empleadas para determinar la disminución de las señales como una consecuencia de la cascada de coagulación respectiva, la cual puede estar relacionada al tiempo de formación de coágulo que es usado por los métodos clásicos de a PTT Y PT.

En la reacción de aPTT conocida, la coagulación se inicia en un plasma de una muestra de paciente por activación de una ruta intrínseca, esto es, por adición de una mezcla de un activador de contacto tal como ácido elárgico o caolín e iones fosfolípidos y calcio. Subsecuentemente, se determina el tiempo hasta que la trombina que es generada ha convertido suficiente fibrinógeno a un coágulo de fibrina visible. Este método conocido es un método de detección insensible relativamente que también requiere altos volúmenes de muestra. El presente método evita estas deficiencias del método conocido. En algunas realizaciones de los presentes métodos, la molécula de fibrinógeno informadora del método aPTT conocida se reemplaza por fragmentos de péptido trombina-sensible derivada de un sustrato de trombina natural tales como Factor III, y se detecta un péptido escindido empleando un sistema de detección que comprende un agente quimioluminiscente y un agente sensibilizador. En otras realizaciones de los presentes métodos, un sustrato que ocurre naturalmente de un factor de coagulación proteolítico específico, por ejemplo un sustrato de trombina tal como Factor III el cual está contenido en la muestra del paciente, se usa como la estructura escindible y escindida del sustrato de origen natural se detecta empleando un sistema de detección que comprende un agente quimioluminiscente y un agente sensibilizador en donde el agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador son capaces de enlazarse en diferentes lados del sitio escindido del sustrato de ocurrencia natural tal como un Factor XIII.

En algunas realizaciones el agente de activación se usa para activar directamente un factor de coagulación proteolítico específico, la estructura escindible tiene un sitio escindido que es escindible por el factor de coagulación proteolítico específico y se determina la actividad del factor de coagulación proteolítico específico. En algunas realizaciones el agente de activación se usa para activar la cascada de coagulación sanguínea como una parte del mismo. La estructura escindible tiene un sitio escindido que es escindible por un factor de coagulación proteolítico corriente abajo de la cascada de coagulación sanguínea y se determina la actividad de uno o más factores de coagulación sanguínea que están corriente arriba del factor de coagulación proteolítico corriente abajo. En algunas realizaciones la estructura escindible tiene un sitio escindido que es escindible por el factor de coagulación proteolítico corriente abajo de la cascada de coagulación sanguínea, la muestra se suspende si contiene un factor de coagulación específico que es corriente arriba del factor de coagulación proteolítico corriente abajo, la combinación adicional comprende una muestra conocida que es deficiente para el factor de coagulación específico, y la actividad del factor de coagulación específico se determina por determinación de la actividad del factor de coagulación proteolítico corriente abajo.

Los reactivos para conducir un método particular en concordancia con las presentes realizaciones pueden estar presentes en un kit útil para comportamiento conveniente en pruebas para analizar el factor de coagulación proteolítico de una cascada de coagulación sanguínea. En una realización un kit comprende un paquete de combinación (a) un agente de activación para activación directa o indirectamente un factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación sanguínea, (b) un agente quimioluminiscente, (c) un agente sensibilizador (d) una estructura escindible la cual tiene un sitio escindido que es escindible por un factor de coagulación proteolítico activado y el cual tiene medios para enlazar el agente quimioluminiscente y medios para enlazar el agente sensibilizador. El agente puede suministrar una entidad separada o reactivos conjugados tales como, por ejemplo, un reactivo en donde el agente quimioluminiscente está unido a la estructura escindible. Los reactivos pueden cada uno estar separados en contenedores, o diferentes reactivos pueden estar combinados en uno o más contenedores dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. Este kit puede adicionalmente incluir otros reactivos empacados separadamente para ejecutar un método particular.

Las cantidades relativas de diversos reactivos en los kits pueden ser variadas ampliamente para suministrar concentraciones de reactivos que sustancialmente optimizan las reacciones que se necesita que ocurran durante el presente método y adicionalmente optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Bajo circunstancias apropiadas uno o más de los reactivos en el kit pueden ser suministrados como un polvo seco, usualmente liofilizado, incluyendo excipientes, los cuales en disolución suministrarán un reactivo en solución que tiene concentraciones apropiadas para llevar a cabo métodos o pruebas en concordancia con la presente invención. El kit puede adicionalmente incluir una descripción escrita de un método en concordancia con la presente invención como se describió anteriormente.

Como se mencionó anteriormente, otra realización de la presente invención es un método para definir una propiedad de activación inhibición o propiedad inhibitoria de una sustancia en uno o más factores de coagulación proteolíticos de una cascada de coagulación sanguínea. Una combinación es suministrada en una mezcla de reacción. La combinación comprende una muestra que contiene uno o más factores de coagulación proteolítica de la cascada de coagulación

sanguínea, y la sustancia que va a ser probada. El efecto de la combinación en un sistema de reactivos comprende una estructura escindible que es evaluada. La estructura escindible tiene un sitio escindido que es escindible por un factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación sanguínea y la estructura escindibles está o llega a estar enlazada al agente quimioluminiscente y agente sensibilizador. El agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador están relacionados en que, cuando en proximidad cercana, la energización del agente sensibilizador resulta en la energización del agente quimioluminiscente. El efecto se relaciona en la activación o propiedad inhibitoria de la sustancia en uno o más factores de coagulación proteolítica de la cascada de coagulación sanguínea en donde el efecto está exento de la escisión de la estructura escindible. El método anterior puede ser llevado a cabo de una manera similar a la que se describe anteriormente para el análisis de la actividad de un factor de coagulación proteolítico que incluye todas las variaciones discutidas anteriormente.

La sustancia que va a ser probada en cuanto a activación o inhibición del factor de coagulación proteolítico puede ser una sustancia sintética o una sustancia de ocurrencia natural o una sustancia de ocurrencia natural modificada sintéticamente. La sustancia puede ser una trombina molecular pequeña tal como, por ejemplo, Dabigatran o Argotaban, una heparina o derivados de heparina tales como fondaparinux, un Factor Xa inhibidor tales como por ejemplo, Danaparoid, una hirudina o derivados de la misma, un veneno de serpiente, un inhibidor fisiológico tal como por ejemplo, antitrombina III, o un inhibidor de estearasa C1, un compuesto activo farmacéuticamente y derivados del mismos, tPA o estreptasa, un factor de plasma concentrado tales como por ejemplo complejos de protrombina o concentrado de Factor VII, una enzima, una proteína, un anticuerpo inhibidor, un ión y así sucesivamente.

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de los presentes métodos por medio de la ilustración y no limitación y su intención es describir y no limitar el alcance de los presentes métodos. Las partes y porcentajes descritos aquí son por volumen al menos que se indique otra cosa.

Ejemplos

Todos los productos químicos fueron adquiridos en la compañía Sigma-Aldrich (St. Louis MO) al menos que se anote otra cosa.

Los siguientes péptidos fueron sintetizados por medio de química estándar Fmoc. La estructura escindible comprende un péptido, el cual consistía de una secuencia BANDERA DYKDDDDK y los terminales N- y las secuencia sensible a la trombina derivadas del factor humano Factor XIII, KLVPRGF, y residuos del terminal C de Glicina unidos a la biotina por medio de un grupo espaciador como se indica más abajo. La secuencia entera fue DYKDDDDKLVPRGFG-NHCH₂-CH₂-NH-Biotina.

El agente quimioluminiscente fue un reactivo partícula referido aquí como Chemibead el cual se preparó de una manera similar al método descrito en la patente de los Estados Unidos No 6, 153,442 y Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No 20050118727A. El Chemibead comprende una lámina inerte de aminodextrano y una lámina externa dexsal que tienen funcionalidades de aldehído libre. El dexal es un aldehído dextrano; véase por ejemplo la patente de los Estados Unidos Nos. 5, 929, 049 y 7, 172, 906. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C, por un periodo de aproximadamente 16 a aproximadamente 64 horas con un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.0, o aproximadamente 6, en un regulador de medio acuoso que emplea un regulador apropiado tal como, por ejemplo MES o similares. La reacción se detuvo por adición de un agente de detección apropiado tal como, por ejemplo carboximetoxioxima (CMO), o similares y subsecuentes en lavados de las partículas. El compuesto quimioluminiscente fue 2-(4-(N,N, di-tetradecilo)-anilino-3-fenil tioxeno.

EL reactivo Chemibeads conjugado al anticuerpo monoclonal antibandera M2 (Sigma, St. Louis) (referido aquí como reactivo Chemibead) fue manufacturado de acuerdo al siguiente procedimiento. El anticuerpo se dializó en un regulador (300 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7.0) usando una columna G25. Subsecuentemente se adicionó el surfactante TWEEN 20® en una concentración de 0.05%, y se concentró el anticuerpo en un concentrador de celda de agitación a 20 mg/mL. Se adicionaron entonces 2 mg de anticuerpo a 20mg del reactivo Chemibeads y se estableció un enlace covalente por adición de 25 mg/mL NaCNBH₃.

Después de un paso de incubación y de intercambio de la reacción, el Chemibeads conjugado se purificó utilizando diafiltración y se almacenó en 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% TRITON® X405 al 0.1%, 1 mg/mL BSA, 0.15% PROCLIN® 300, 0.1 mg/mL de sulfato de neomicina, pH 8.0.

El agente sensibilizador fue un reactivo en partícula referido aquí como un agente Sensibead el cual se preparó usando un método análogo al descrito en la patente de los Estados Unidos No. 6, 153, 442 y en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No 20050118727A. El fotosensibilizador fue bis-(trihexilo)-silicio-t-butil-ftalocianina.

Ejemplo 1

- 5 El péptido sensible a la trombina como se describió anteriormente se disolvió en agua a 0-1000 ng/mL. El reactivo Chemibead se diluyó en 100 ug/mL, el reactivo Sensibead en 500 ug/mL en un regulador que contenía 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % TRITON® X405, 1 mg/mL BSA, 0.15% PROCLIN®300, 0.1 mg/mL sulfato de neomicina, pH 8.0. Se usaron y prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante Plasma humano estándar (SHP) y un factor deficiente en plasmas de Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (Marburg, Alemania). Las muestras de plasma se diluyeron principalmente en NaCl al 0.9 % inmediatamente antes del experimento. El factor de tejido recombinante con base en agua de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En algunos experimentos, se adicionaron 3 mg/mL del péptido inhibidor del coágulo (Bachem, Bubendorf, Suiza) al reactivo INNOVIN®.
- 10 Para la prueba, se combinaron e incubaron 10 ul de muestra de plasma 10 ul de péptido y 10 ul de INNOVIN®a durante 7 minutos a 37°C. Se adicionaron 10ul del reactivo Chemibead seguido por un periodo de incubación de 3 minutos a 37°C. Subsecuentemente se adicionaron 10ml del reactivo Sensibead y la reacción se incubó por otros 6 minutos a 37°C. El contenedor de la reacción se llenó con agua destilada a 250 ml y se iluminó a 680 nm. La señal quimioluminiscente se midió por 100 ms a 612 nm usando un fotodetector de una plataforma comercial (DIMENSION VISTA®, adquirido a Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, Illinois).
- 15 En un primer paso de los experimentos, se determinó la concentración óptima del péptido. Se probaron varias concentraciones (véase Tabla donde las señales están en conteo k.) En línea con el concepto del presente método, se observó ya un fuerte descenso en la señal (= actividad de la ruta extrínseca) con respecto al control llevado a cabo con NaCl al 0.9 % al probar tan poco como 1 % SHP (= 0.1 µl plasma). Aunque la sensibilidad de la prueba fue la más alta cuando se usaron 125 ng/mL de péptido, 1000 ng/mL de péptido dieron la señal global más fuerte y fue usado para pruebas subsiguientes. Una representación gráfica de los datos se muestra en la figura 2.
- 20

SHP %	1000 ng/ml	500 ng/ml	250 ng/ml	125 ng/ml
0	2981	1311	475	78
0.01	3053	1387	476	85
0.05	3026	1401	447	82
0.1	3025	1399	475	88
0.5	3063	1357	460	85
1	2939	1348	429	74
5	2199	841	197	31
10	1372	372	61	11
50	9	4	2	2
100	3	4	2	2

- 25 Para probar si el descenso dependiente de SHP en señal se causó por la activación de una ruta extrínseca, un experimento de control se llevó a cabo en el cual un componente individual fue dejado fuera. Estas pruebas demostraron que la disminución en la señal fue dependiente tanto en el SHP (que contiene componentes de la ruta extrínseca y del INOBINR (es un activador de la ruta intrínseca), y la señal fue dependiente del péptido (véase tabla 2), las señales están en conteos k. El coágulo inhibidor del péptido no se requirió necesariamente, indicando que la coagulación de la muestra de plasma diluido no ocurrió o no influyó la señal de reacción.

Controles	SHP %	1000 ng/ml	500 ng/ml
+Innovin+Coágulo inhibidor	NaCl	3007	1346
	1	3015-	1319
	10	1532	361
	100	4	3
-Innovin+Coágulo inhibidor	NaCl	3996	2323
	1	4006	2338
	10	3921	2238
	100	3432	1910
+Innovin-Coágulo inhibidor	NaCl	3374	1656
	1	3337	1574
	10	416	50
	100	8	5
No péptido	NaCl	4	---
	1	3	---
	10	2	---
	100	2	---

5 La siguiente prueba determina que la disminución en señal del sistema de prueba puede ser usada para detectar deficiencias de coagulación en la ruta extrínseca. Deficiencias en factores VII, X o protrombina respectivamente en muestras de plasma llevan a reducir el escindido del péptido sensible a la trombina cuando se compara al SHP. El cual contiene todos los factores de la ruta extrínseca. En contraste, la deficiencia en Factor VIII o IX, ambos constituyentes de la ruta intrínseca, tiene poco o ningún impacto en el péptido escindido.

10 Como se muestra en la figura 3, el dato experimental obtenido con 1:5 diluciones de plasma confirmado anteriormente. En comparación el control de reacción con SHP, la señal fue mayor cuando se probó la muestra de plasma deficiente en Factores VII, X o protrombina, respectivamente. En contraste, las muestras de plasma deficientes en factores VII o IX, los cuales no son componentes de la ruta extrínseca, mostraron un nivel de señal comparable al SHP. Este dato muestra que el sistema de prueba puede ser usado como una prueba de coagulación global (barrido) para detectar una deficiencia en los factores de la ruta extrínseca. En contraste una reacción PT clásica, se requirió menos que 1/10 del volumen de la muestra, lo cual reduce los problemas asociados con volúmenes altos de muestra (muestras HIL, consumo de muestras altas, las cuales no permiten pruebas de sangre entera)

Ejemplo 2

20 El Péptido sensible a la trombina, se preparó tal como se describió anteriormente se disolvió en agua a 0-1000 ng/mL. El reactivo Chemibead se diluyó en 100 µg. El reactivo Sensibead se disolvió en 500 mg/mL en un regulador que contiene 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Triton X® 405, 1 mg/mL BSA, 0.15 % Proclin® 300, 0.1 mg/mL sulfato de neomicina, pH 8.0. Estándar de PlasmaH (SHP) y factor deficiente en plasma de Siemens Healthcare-Diagnostics Products GmbH se usó y preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de plasma se diluyeron manualmente en NaCl al 0.9 % inmediatamente antes del experimento. El reactivo de aPTT

Pathromtin SL® (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH) que contiene fosfolípidos y activadores de dióxido de silicio se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se complementó con 3 mg/mL péptido inhibidor del Coágulo (Bachem).

5 Para la prueba, se combinaron 10 µl de muestra de plasma y 10 µl de Pathromtin SL ® e incubaron por 7 minutos a 37°C. Se adicionaron 10 µl 50 mM de CaCl₂ y 20 µl de anti-bandera-conjugada al reactivo Chemibead, seguido por 3 minutos de incubación a 37°C. Subsecuentemente se adicionaron 20 µl del reactivo Sensibead y la reacción se llevó a incubación por otros 6 minutos a 37°C. El recipiente de reacción fue entonces llenado con agua destilada e iluminado a 680 nm. Se midieron señales quimioluminiscente para 100 ms.

10 En un primer conjunto de experimentos, se determinó la concentración óptima del péptido. Se probaron dos concentraciones (verse tabla 3, señales en conteos k). En línea con la presente realización, se observó un fuerte decrecimiento en la señal (actividad de la ruta extrínseca) relativa al control realizado con NaCl al 0.9 %. La señal total más fuerte dio 1000 ng/mL de péptido y se tomó para pruebas subsecuentes.

SHP %	1000 ng/ml	100 ng/ml
0	567	39
100	7	1

15 Los siguientes experimentos mostraron que la disminución en señal de esta realización en el presente sistema de prueba puede ser usada para detectar deficiencias en factores de coagulación en la ruta intrínseca. Factores de eficiencia VIII, IX, X o XI o trombina respectivamente en muestras de plasma resultó en un escisión reducida del péptido cuando se comparó al SHP, el cual tiene todos los factores de la ruta extrínseca. En contraste, la deficiencia en el factor VII tendría poco o ningún impacto en el péptido escindido.

20 Como se muestra en la Figura 4, los datos experimentales obtenidos con las diluciones de plasma demostraron los resultados anteriores. En comparación al control de reacción con SHP o un factor VII deficiente en plasma, la señal fue más alta cuando se probaron las muestras de plasma deficientes en factores VIII, IX, X, XI o trombina, respectivamente, significando que estos factores son requeridos para escindir el péptido. Esta prueba llevada a cabo detectando la deficiencia de factores involucrados en la ruta intrínseca.

25 Para permitir una comparación de los resultados obtenidos por ensayos convencionales de PT Y aPTT para los resultados del péptido escindido antes mencionado la ratas obtenidas en los ensayos descritos anteriormente en concordancia con los métodos presentes, el presente ensayo y el ensayo convencional que son llevados a cabo con los mismos reactivos son calibrados con diluciones de una reserva de plasma normal tal como plasma humano estándar. Para cada dilución, la señal quimioluminiscente respectiva y el tiempo de coagulación están correlacionados. De esta manera, una curva de calibración se genera ya sea cuando los tiempos de coagulación son correlacionados a las señales quimioluminiscente. Una muestra desconocida que es medida por uno de las realizaciones de los presentes métodos, por lo tanto puede ser relacionada al respectivo método convencional.

Ejemplo 3

35 El péptido sensible a la trombina preparado como se describe anteriormente se disolvió en agua a 1 µg/mL. El reactivo Chemibead como se describió anteriormente se diluyó a 100 µg/ml, el reactivo Sensibead como se describió anteriormente se diluyó a 500 µg/ml en un regulador que contiene 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Triton X® 405, 1 mg/mL BSA, 0.15% de Proclin® 300, 0.1 mg/mL de sulfato de neomicina, pH 8.0 Se usó y preparó Plasma Humano Estándar (SHP) de Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La muestra de plasma se diluyó manualmente en NaCl al 0.9% inmediatamente antes del experimento.

40 El veneno de serpiente Ecarina se adquirió en Pentapharm (Basilea, Suiza) y se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los inhibidores directos de trombina hirudina (adquirida en Pharmion como Refludan) y melagatran (adquirido en Astra Zeneca) se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

45 Para el método de prueba, se diluyeron 10 µl de muestra de plasma y 10 µl de Ecarina (0,6 - 2 U/mL) se combinaron e incubaron por 7 minutos a 37°C. Se adicionaron 20µl de anti-bandera-conjugada se incubaron el reactivo Chemibead y 10µl del reactivo Sensibead, y la mezcla de reacción por otros 6 minutos a 37°C. La mezcla de reacción fue completada con agua destilada e iluminada a 680 nm. La señal quimioluminiscente se midió para 100 ms.

5 En un primer paso del experimento, el efecto de adición de los inhibidores directos de trombina para el Plasma Humano Estándar sobre la señal quimioluminiscente se terminó en la prueba definida descrita anteriormente. Las muestras SHP se sembraron con diferentes cantidades de hirudina o melagatran, y probada como 1: 4 diluciones (diluida con NaCl al 0.9%) en la definición de la prueba descrita anteriormente. Como se muestra en la Fig. 5, la presencia de concentraciones terapéuticamente relevantes de melagatran o hirudina llevan a una concentración dependiente reducida escindida del péptido que producen señales quimioluminiscentes más altas cuando se compara con una muestra de SHP sin el inhibidor respectivo. Aquí, este ensayo puede detectar la presencia de inhibidores directos de trombina.

10 Para permitir una determinación cuantitativa de la concentración de un inhibidor directo de trombina en una muestra de plasma, el ensayo descrito anteriormente se calibró con diluciones de SHP. La activación de trombina se llevó a cabo con heparina diluida a 0,6 U/mL. Una curva de referencia típica se muestra en la Fig. 6. La actividad de trombina del SHP no diluido fue definida arbitrariamente como 100 %. Las muestras de SHP sembradas con 0,1 µg/mL o 1 µg/mL hirudina fueron probadas entonces en el mismo conjunto anterior. Las señales quimioluminiscentes de las muestras sembradas fueron entonces comparadas con el valor respectivo de la curva de referencia, por lo cual los valores de actividad de trombina se asignaron a las muestras sembradas. Las muestras sembradas con 0,1 mg/mL de hirudina, la cual es una concentración subterapéutica, se determinó con 445 k de conteo los cuales corresponden a una actividad de trombina residual de 79,5% comparada con 100% de una muestra no sembrada. La muestra sembrada con 0,1 µg/mL de hirudina, la cual es una concentración terapéuticamente relevante se determinó con 914 k de conteo los cuales corresponden a una actividad de trombina residual de 32,3% comparada con 100% de una muestra no sembrada. Aquí, la concentración del inhibidor de trombina directa, la hirudina puede ser cuantificada por el presente método.

25 Aunque la invención antecedente ha sido descrita en detalle por medio de ilustración y ejemplos para propósitos de claridad y entendimiento, será fácilmente evidente para expertos usualmente en la técnica y a la luz de las técnicas de esta invención que pueden hacerse cambios y modificaciones en la misma. Adicionalmente, la descripción anterior, la explicación del propósito, usa específicamente nomenclatura para proveer un entendimiento a través de la invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que no se requieren los detalles específicos para practicar la invención. Así, la descripción anterior de las relaciones específicas de la presente invención se presenta para propósitos de ilustración y descripción; no se ha intentado ser exhaustivos o limitar la invención a formas precisas divulgadas. Muchas modificaciones y variaciones son posibles en vista de las técnicas anteriores. Las realizaciones fueron escogidas y descritas para explicar los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas y por lo tanto otros expertos en la técnica pueden utilizar la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la actividad de factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación en sangre de una muestra, comprendiendo el método:
- 5 a) suministrar en combinación en una mezcla de reacción:
- (i) la muestra,
- (ii) un agente de activación para activación directa o indirecta del factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación sanguínea.
- 10 (iii) una estructura escindible la cual tiene un sitio de escisión que es escindible por el factor de coagulación proteolítico activado y en donde la estructura escindible está o llega a estar enlazada al agente quimioluminiscente y a un agente sensibilizador
- (iv) un agente quimioluminiscente, y
- (v) un agente sensibilizador
- 15 en donde el agente quimioluminiscente y el agente sensibilizador están relacionados en que, cuando están en cercana proximidad, la energización del agente sensibilizador da como resultado la energización del agente quimioluminiscente;
- (b) mención de la señal quimioluminiscente y relación de la señal de la actividad del factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación sanguínea.
2. El método de la reivindicación 1 en donde la estructura escindible está contenida en un reactivo separado el cual es adicionado a la mezcla de reacción.
- 20 3. El método de la reivindicación 2 en donde la estructura escindible está enlazada al agente quimioluminiscente y/o al agente sensibilizador en el reactivo separado.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3 en donde la estructura escindible comprende un péptido de 3 a 150 unidades de monómeros de longitud.
- 25 5. El método de la reivindicación 1 en donde la estructura escindible es un sustrato natural del factor de coagulación proteolítico el cual está contenido en la muestra y el cual llega a estar enlazado con el agente quimioluminiscente y con el agente sensibilizador en la mezcla de reacción.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la muestra es sangre entera o plasma.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el agente sensibilizador es un fotosensibilizador que genera oxígeno singlete sobre la radiación y oxígeno singlete que energiza el agente quimioluminiscente.
- 30 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el agente quimioluminiscente comprende una partícula que tiene asociada con la misma un componente quimioluminiscente.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el agente sensibilizador comprende una partícula que tiene asociado con la misma un compuesto sensibilizador
- 35 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la señal quimioluminiscente es universalmente proporcional a la actividad del factor de coagulación proteolítico activado.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el factor de coagulación proteolítico se selecciona del grupo que consiste de Factor II, Factor VII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII y proteína C.
- 40 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el agente de activación para activación directa o indirecta del factor de coagulación proteolítica se selecciona del grupo que consiste de tromboplastina, Factor IIa, Factor VIIa, Factor IXa, Factor Xa, Factor XIa, Factor XIIa, y proteína C activada, veneno de serpiente, fosfolípidos

cargados negativamente, iones calcio, factores de tejido, sílica, caolín, ácido elálgico y celita.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la actividad del factor de coagulación proteolítico activado es indicativa de la presencia o actividad de uno o más componentes de la muestra que va a ser analizada que influencia la actividad del factor de coagulación proteolítico.
- 5 14. El método de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes en donde adicionalmente se adiciona a la mezcla de reacción plasma o sangre entera la cual es deficiente en un componente individual el cual influencia la actividad del factor de coagulación proteolítico por ser determinado y en donde la actividad del factor de coagulación proteolítico que va a ser determinado es indicativa del dicho componente unitario en la muestra.
- 10 15. El método de acuerdo a la reivindicación 1 en donde la actividad del factor de coagulación proteolítico activado es indicativa de la funcionalidad de la ruta intrínseca de la cascada de coagulación sanguínea.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la actividad del factor de coagulación proteolítico activado es indicativa de la funcionalidad de la ruta extrínseca de la cascada de coagulación sanguínea.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la actividad del factor de coagulación proteolítico activado es indicativa de la presencia de uno o más anticoagulantes terapéuticos.
- 15 18. Un kit para uso en un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo el kit los siguientes componentes:
- (a) un agente de activación para la activación directa o indirecta del factor de coagulación proteolítico de la cascada de coagulación sanguínea
- (b) un agente quimioluminiscente,
- 20 (c) un agente sensibilizador, y
- (d) una estructura escindible la cual tiene un sitio de escisión que es escindible por un factor de coagulación proteolítico activado y la cual tiene medios para enlazar el agente quimioluminiscente y un agente sensibilizador.
19. Un kit de acuerdo con la reivindicación 18 en donde la estructura escindible está enlazada al agente quimioluminiscente y/o al agente sensibilizador.

Figura 1

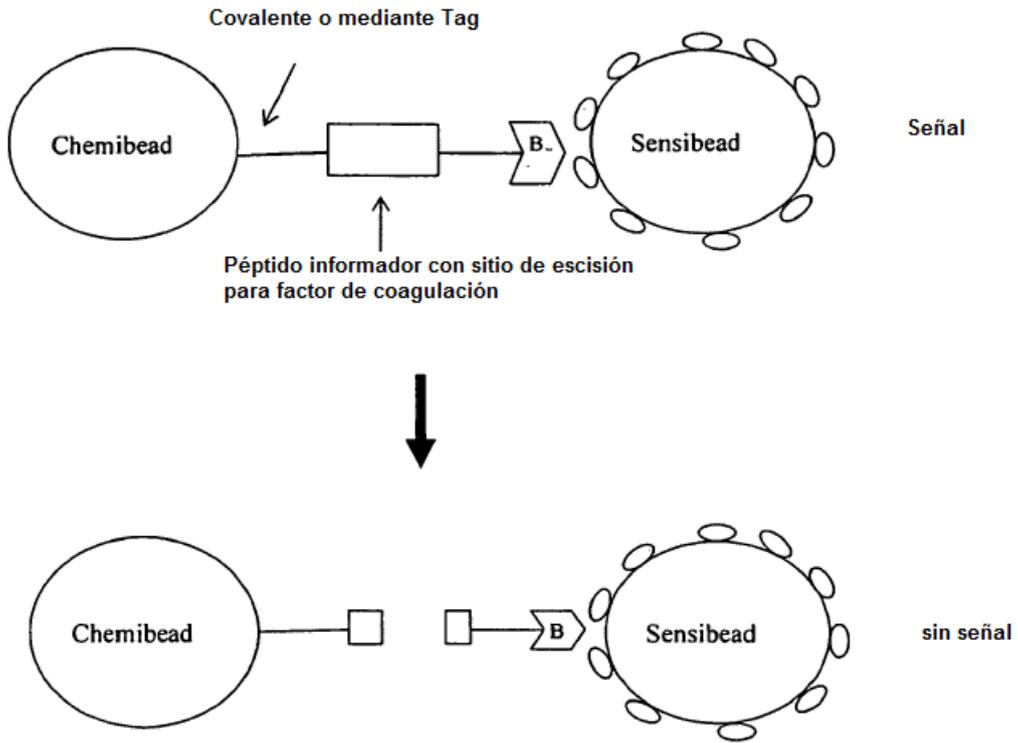
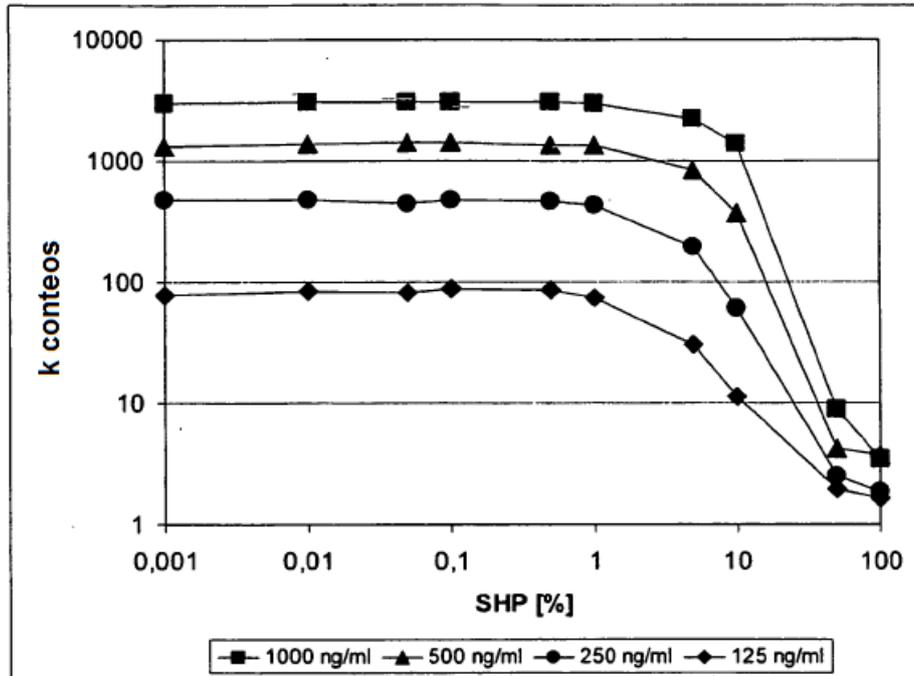
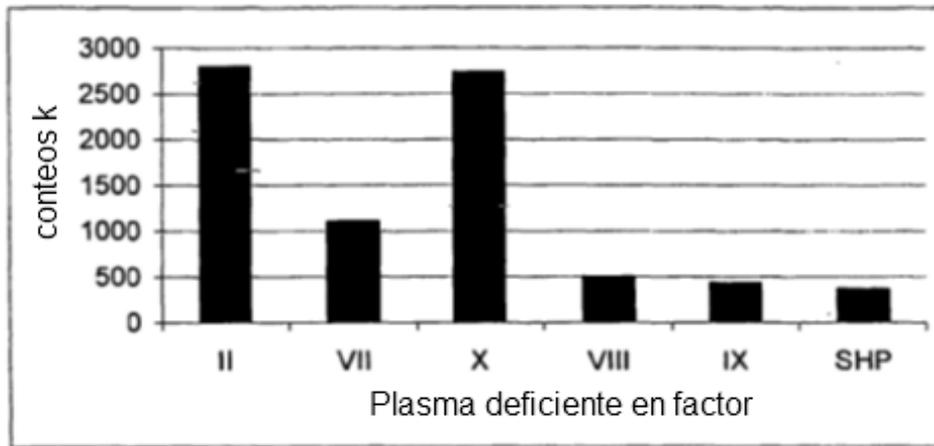


Figura 2



5

Figura 3



5

Figura 4

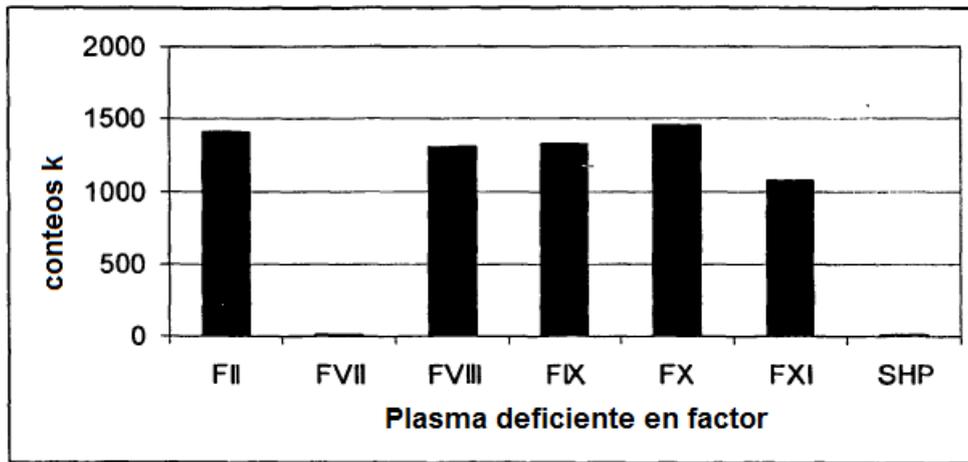
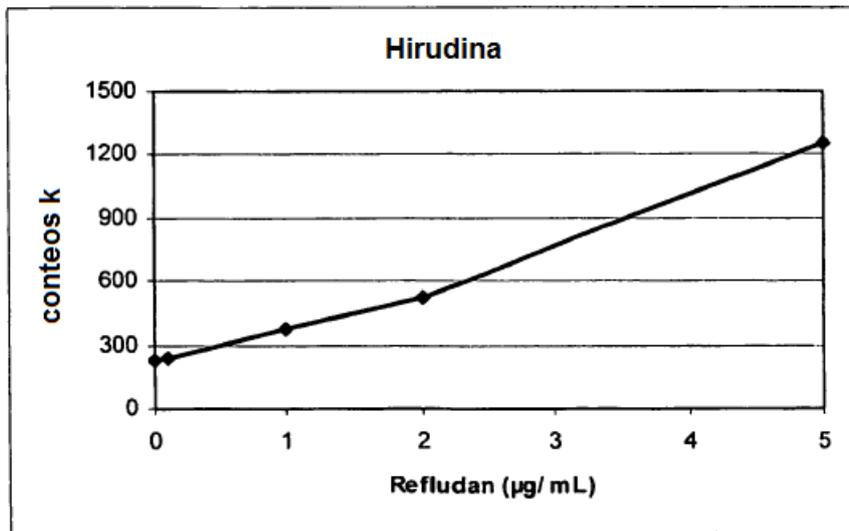
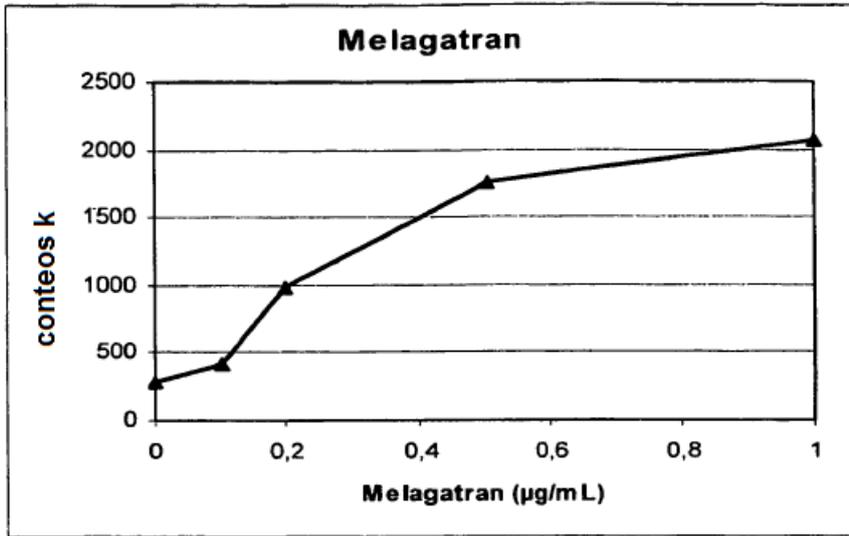


Figura 5



5

Figura 6

