

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 758**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/86** (2006.01)  
**C12N 9/96** (2006.01)  
**C12Q 1/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07849800 .3**  
96 Fecha de presentación: **06.12.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2096440**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Procedimiento para estabilizar la alfa-trombina en solución que contiene trombina**

30 Prioridad:  
**21.12.2006 JP 2006344121**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.06.2012**

73 Titular/es:  
**Sekisui Medical Co., Ltd.**  
**13-5, Nihonbashi 3-chome Chuo-ku**  
**Tokyo 103-0027, JP**

72 Inventor/es:  
**IKEDA, Remi;**  
**MORIKAWA, Chizuru y**  
**YAGO, Hirokazu**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 382 758 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**

Procedimiento para estabilizar la  $\alpha$ -trombina en solución que contiene trombina

**5 Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un procedimiento para estabilizar la  $\alpha$ -trombina inestable contenida en una solución que contiene trombina.

**10 Técnica anterior**

El fibrinógeno es un precursor de la fibrina, que es una proteína predominante que forma coágulos de sangre y se produce en las células parenquimatosas hepáticas. En el cuerpo humano, en el plasma hay aproximadamente un 80 % de fibrinógeno (p. ej., de aproximadamente 200 a 400 mg/dl en un adulto sano) y la cantidad restante está presente en los tejidos. El fibrinógeno es una glicoproteína que contiene tres cadenas polipeptídicas apareadas (es decir,  $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$ ) acopladas a través de un enlace disulfuro. Cuando las cadenas  $A\alpha$  y las cadenas  $B\beta$  se escinden del fibrinógeno mediante la trombina, se forma fibrina. La fibrina desempeña el papel principal en la formación de trombos y la hemostasia. Clínicamente, el fibrinógeno aumenta en condiciones de inflamación y disminuye en los trastornos hepáticos graves, CID etc.

El fibrinógeno se puede analizar mediante el método de Clauss (procedimiento de adición de trombina), el procedimiento derivado de PT (procedimiento del tiempo de coagulación), TIA (inmunoensayo turbidimétrico), el procedimiento del látex etc. Entre ellos, con frecuencia se usa el procedimiento de adición de trombina. Específicamente, se añaden trombina y cloruro cálcico a una muestra de plasma a la que se ha añadido citrato sódico y se mide el tiempo de coagulación. La concentración de fibrinógeno (mg/dl) en la muestra se calcula mediante una curva de calibración obtenida a partir de los tiempos de coagulación a concentraciones conocidas de fibrinógeno.

Una trombina en el ensayo de fibrinógeno es  $\alpha$ -trombina, que se produce mediante la escisión de un péptido de protrombina (es decir, precursor de la trombina) y exhibe actividad de coagulación. Se sabe que la  $\alpha$ -trombina sufre autodescomposición para formar  $\beta$ -trombina o, además, para formar  $\gamma$ -trombina, que son trombinas de bajo peso molecular sin actividad de coagulación. Por tanto, en general, la  $\alpha$ -trombina se liofiliza para almacenamiento a largo plazo.

Se han realizado varios intentos para estabilizar la trombina en una solución. Por ejemplo, se han conocido varios procedimientos, tales como: (1) un procedimiento en el que se añaden concentraciones altas de glicerol y poliol (p. ej., sacarosa, manitol, sorbitol etc.) a la trombina (Documento patente 1); y (2) un procedimiento en el que a la trombina se añaden sacáridos, aminoácidos etc. (Documento patente 2). No obstante, estos procedimientos exhiben un efectos insatisfactorio de estabilizar la trombina en un ensayo/reactivo de fibrinógeno líquido.

Un procedimiento de estabilización conocido para la trombina contenida en un reactivo de ensayo de fibrinógeno incluye añadir un antagonista de trombina a una solución que contiene trombina (Documento patente 3). No obstante, el mecanismo de este procedimiento se basa en la inhibición de la actividad de la trombina. Por tanto, cuando se usa este procedimiento, el tiempo de coagulación de una muestra de concentración baja de fibrinógeno, que es una muestra importante en ensayo de fibrinógeno, se prolonga considerablemente y, en algunas ocasiones, no detectable. La prolongación del tiempo de coagulación produce reducción del rendimiento de la muestra y los fallos en el análisis de las muestras con concentración baja de fibrinógeno producen un incremento del número de muestras que se tienen que volver a analizar. Por tanto, el procedimiento anterior no es adecuado para un ensayo médico de urgencia.

En estas circunstancias, existe la necesidad de un procedimiento para estabilizar la  $\alpha$ -trombina en una solución que contiene  $\alpha$ -trombina, que se puede realizar en muestras de concentración baja de fibrinógeno sin producir una prolongación considerable del tiempo del ensayo y con pocos efectos sobre las mediciones, por lo que es aplicable a los reactivos de ensayo con fibrinógeno líquido.

Documento de patente 1: JP-A-1987-106028

Documento de patente 2: JP-A-1989-040433

Documento de patente 3: JP-A-2004-191367

**60 Divulgación de la invención****Problemas que ha de resolver la invención**

El objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para estabilizar la  $\alpha$ -trombina inestable contenida en una solución que contiene trombina.

### Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores han llevado a cabo extensos estudios con el fin de alcanzar los objetos mencionados anteriormente y han descubierto que la  $\beta$ -trombina y la  $\gamma$ -trombina, anteriormente consideradas simples productos de autodescomposición de la  $\alpha$ -trombina, tienen una actividad de descomposición de la  $\alpha$ -trombina más fuerte que la actividad de autodescomposición de la  $\alpha$ -trombina. Bastante sorprendentemente, los inventores también han descubierto que suprimiendo la(s) cantidad(es) de  $\beta$ -trombina y/o de  $\gamma$ -trombina con respecto a la cantidad de trombina total para que entre dentro de un cierto intervalo bajo, la  $\alpha$ -trombina, previamente considerada inestable debido a la actividad de autodescomposición, se puede estabilizar en una solución que contiene  $\alpha$ -trombina. La presente invención se ha conseguido sobre la base de estos hallazgos.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un procedimiento para estabilizar la  $\alpha$ -trombina en una solución que contiene trombina, que incluye ajustar el porcentaje de  $\alpha$ -trombina al 70 % o más con respecto a la cantidad de trombina total en la solución que contiene trombina.

### Efectos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se puede evitar la disminución del porcentaje restante y la actividad de  $\alpha$ -trombina en una solución que contiene trombina, de modo que se puede mejorar la estabilidad y la calidad de la solución que contiene trombina. Además, la invención puede mejorar la estabilidad y la calidad durante el almacenamiento de un reactivo de ensayo de fibrinógeno adecuado para ensayos médicos de urgencia.

### Breve descripción de las figuras

[Fig. 1] Imágenes en SDS-PAGE al 10-20% de trombina purificada. La imagen de la izquierda corresponde a  $\alpha$ -trombina purificada y la imagen de la derecha corresponde a una mezcla de  $\beta$ - y  $\gamma$ -trombinas. A indica una banda atribuida a la  $\alpha$ -trombina y B indica una banda atribuida a las  $\beta$ - y  $\gamma$ -trombinas.

[Fig. 2] Gráfico que muestra los porcentajes del contenido de  $\alpha$ -trombina restantes tras un ensayo acelerado (37 °C), siendo el tiempo de coagulación la semana 0 del 100%.

[Fig. 3] Gráfico que muestra la actividad de la trombina tras un ensayo acelerado (37 °C), siendo el tiempo de coagulación la semana 0 del 100%.

[Fig. 4] Gráfico que muestra la prolongación del tiempo de coagulación observada en la muestra 1 tras un ensayo acelerado (37 °C), siendo el tiempo de coagulación la semana 0 del 100%.

[Fig. 5] Gráfico que muestra la prolongación del tiempo de coagulación observada en la muestra 2 tras un ensayo acelerado (37 °C), siendo el tiempo de coagulación la semana 0 del 100%.

### Mejores modos para llevar a cabo la invención

En la presente invención, el contenido en  $\alpha$ -trombina con respecto a la cantidad de la trombina total en una solución que contiene trombina es del 70 % o superior, preferentemente del 80 % o superior, más preferentemente del 90 % o superior. Todavía más preferentemente, el contenido en  $\alpha$ -trombina es del 70 % o superior y el contenido en  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina es inferior al 30 %, todavía más preferentemente el contenido en  $\alpha$ -trombina es del 80 % o superior y el contenido en  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina es inferior al 20 %, y, particularmente preferentemente, el contenido en  $\alpha$ -trombina es del 90 % o superior y el contenido en  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina es inferior al 10 %, con respecto a la cantidad de trombina total en una solución que contiene trombina.

En la presente invención, como se ha descrito en los siguientes Ejemplos de la presente invención, a medida que aumenta el contenido en  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina con respecto a la cantidad de la trombina total, los mayores niveles de  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina reducen el porcentaje restante y la actividad de la  $\alpha$ -trombina en una solución que contiene trombina. Por tanto, elevando el contenido en  $\alpha$ -trombina con respecto a la cantidad de trombina total y, a su vez, reduciendo el contenido en  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina con respecto a la cantidad de trombina total, se puede mejorar la estabilidad y la calidad durante el almacenamiento de la  $\alpha$ -trombina en una solución.

Como se usa en el presente documento, el término "trombina" se refiere a trombina incluida la  $\alpha$ -trombina, y la expresión "trombina total" se refiere a  $\alpha$ -trombina,  $\beta$ -trombina y  $\gamma$ -trombina.

En la presente invención, el contenido en  $\alpha$ -trombina con respecto a la cantidad de trombina total se puede determinar en base a la ecuación siguiente (1) tras medición de  $\alpha$ -trombina,  $\beta$ -trombina y  $\gamma$ -trombina, respectivamente, mediante un procedimiento conocido de determinación cuantitativa de la trombina.

**contenido en  $\alpha$ -trombina (%) con respecto a la cantidad de trombina total**

$$= (\alpha\text{-trombina} / \text{trombina total}) \times 100. \quad (1)$$

De forma similar, el contenido en  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina con respecto a la cantidad de trombina total se puede determinar en base a la ecuación siguiente (2).

**contenido en  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina (%) con respecto a la cantidad de trombina total**

$$= (\beta\text{- y/o } \gamma\text{-trombina/trombina total}) \times 100. \quad (2)$$

- 5 La trombina se puede cuantificar mediante, por ejemplo, medición de la actividad o determinación proteica mediante densitometría. Se puede usar cualquier procedimiento. Antes de la medición, la  $\alpha$ -trombina y los productos de descomposición de la misma se pueden aislar opcionalmente o purificar mediante cualquier procedimiento conocido.
- 10 Más específicamente, cuando el contenido en  $\alpha$ -trombina se determina mediante el procedimiento de medición de la actividad (un procedimiento de sustrato cromogénico) usando un sustrato cromogénico S-2238 (producto de Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -trombinas se fraccionan por medio de una resina de intercambio iónico conocida y se determina la actividad de descomposición de cada fracción en S-2238, mediante lo cual se puede determinar la actividad relativa de la  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -trombina (%) respecto a la actividad de la trombina total.
- 15 Asimismo, cuando se usa densitometría, las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -trombinas se fraccionan mediante un procedimiento conocido de electroforesis para análisis de proteínas y el contenido proteico de cada fracción se determina mediante densitometría, mediante lo cual se puede determinar el contenido proteico de la  $\alpha$ -trombina (%) con respecto al contenido proteico de las trombinas totales.
- 20 La especie de trombina usada en la presente invención puede ser cualquier trombina procedente de animal, tal como un ser humano, trombinas preparadas mediante ingeniería genética y disponibles comercialmente como productos farmacéuticos.
- 25 Las trombinas usadas en la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos conocidos de separación/purificación de proteínas; por ejemplo filtración, lavado, secado, recristalización, tratamientos cromatográficos, HPLC y separación líquido-líquido. Más específicamente, se pueden usar resinas de intercambio iónico, tal como resina de intercambio catiónico, resina de afinidad, tal como resina de benzamidina, membrana de ultrafiltración y filtración en gel.
- 30 La combinación de estos procedimientos se puede diseñar adecuadamente de modo que se pueda incrementar el contenido en  $\alpha$ -trombina con respecto a la cantidad de trombina total.
- 35 La solución que contiene trombina usada en la presente invención es una solución acuosa, una solución de disolvente orgánico o una solución mixta de agua-disolvente orgánico en la que la trombina se suspende o disuelve en agua y/o disolvente orgánico. Entre ellos, se prefiere la solución acuosa y la solución mixta de agua-disolvente orgánico. No se impone ninguna limitación concreta sobre el disolvente orgánico, siempre que no altere la medición del fibrinógeno (p. ej., mediante descomposición o inhibición de la actividad de la  $\alpha$ -trombina). Ejemplos de disolvente orgánico incluyen dimetilsulfóxido, glicerol, polietilenglicol y polipilenglicol. Estos disolvente se pueden usar solos o en combinación de dos o más especies.
- 40 El pH de la solución que contiene trombina usada en la presente invención no necesariamente se controla.
- 45 No obstante, el pH es, preferentemente, de 4 a 9, más preferentemente de 5,5 a 7, todavía más preferentemente de 6 a 6,5, con el fin de prevenir la descomposición e inhibir la actividad de la -trombina.
- 50 Para ajustar el pH de 4 a 9, se puede usar adecuadamente un tampón que puede controlar el pH para que entre dentro de un intervalo de 4 a 9- Ejemplos de dicho tampón incluyen ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido acético, imidazol, HEPES, MOPS, BIS-TRIS, TRIS, MOPSO, ADA y MES. Estos tampones se pueden usar solos o en combinación de dos o más especies. En el caso en el que el pH se ajuste a de 5,5 a 7 o a de 6 a 6,5, se puede usar ácido cítrico, ácido fosfórico, imidazol BIS-TRIS, MOPSO, ADA, MES, etc. Estos tampones se pueden usar solos o en combinación de dos o más especies.
- 55 No se impone ninguna limitación concreta sobre la cantidad de tampón(es) añadida a la solución que contiene trombina, siempre que se pueda asegurar la acción de tamponamiento. Por ejemplo, la concentración de tampón de una solución que contiene trombina es, preferentemente, de 5 a 1000 mM, particularmente preferentemente de 20 a 300 mM.
- 60 No se impone ninguna limitación concreta sobre la actividad de la  $\alpha$ -trombina de la solución que contiene trombina usada en la presente invención, siempre que la actividad de la  $\alpha$ -trombina se ajuste a un valor diana en función del contenido en  $\alpha$ -trombina con respecto a la cantidad de trombina total. Por ejemplo, cuando la solución que contiene trombina se usa como reactivo de ensayo de fibrinógeno, la actividad de  $\alpha$ -trombina es, preferentemente, de 20 a 1.000 unidades/ml determinado mediante un procedimiento de sustrato cromogénico conocido, más preferentemente de 50 a 500 unidades/ml, particularmente preferentemente de 100 a 300 unidades/ml.
- 65 La solución que contiene trombina usada en la presente invención puede contener adecuadamente compuestos conocidos como los que se mencionan más adelante, siempre que no impida el ensayo de fibrinógeno, y puede

prepararse mediante un procedimiento de producción conocido.

La solución que contiene trombina puede contener adecuadamente un compuesto conocido usado para, por ejemplo, estabilizar la  $\alpha$ -trombina, siempre que no se impida el ensayo de fibrinógeno.

5 Ejemplos de estos compuestos pueden incluir iones de calcio, ácidos orgánicos, tensioactivos y proteínas.

Ejemplos específicos de los iones de calcio incluyen, preferentemente, un compuesto de calcio hidrosoluble, tal como cloruro cálcico, lactato cálcico, gluconato cálcico, glucuronato cálcico y tartrato cálcico. Estos compuestos de calcio se pueden usar solos o en combinación de dos o más especies. No se impone ninguna limitación concreta sobre la cantidad eficaz del/los compuesto(s) de calcio para estabilizar la  $\alpha$ -trombina, siempre que se incremente la estabilidad de la  $\alpha$ -trombina. Por ejemplo, la concentración de calcio en la solución que contiene trombina es, preferentemente, de 5 mM a 100 mM, más preferentemente de 10 mM a 50 mM.

15 Ejemplos específicos de los ácidos orgánicos incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido glucurónico, ácido glicólico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glutárico, ácido aminoacético y ácido aminocaproico. Estos ácidos pueden estar en forma de ácido libre o la forma de sal. Estos ácidos orgánicos se pueden usar solos o en combinación de dos o más especies. No se impone ninguna limitación concreta sobre la(s) cantidad(es) de ácidos orgánicos añadida(s) a la solución que contiene trombina, siempre que se incremente la estabilidad de la solución que contiene  $\alpha$ -trombina. Por ejemplo, la concentración de ácido orgánico en la solución que contiene trombina es, preferentemente, de 10 mM a 500 mM, más preferentemente de 50 mM a 200 mM.

Ejemplos de los tensioactivos pueden ser cualquiera de los tensioactivos aniónicos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfólicos y tensioactivos no iónicos. Específicamente, los tensioactivos incluyen los siguientes:

25 Ejemplos de los tensioactivos aniónicos incluyen dodecilsulfato sódico, dodecilsulfonato sódico, dodecil-N-sarcosinato sódico, colato sódico, desoxicolato sódico y taurodesoxicolato sódico. Ejemplos de los tensioactivos catiónicos incluyen bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de tetradecilamonio y cloruro de dodecilmiridinio. Ejemplos de los tensioactivos anfólicos incluyen ácido 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfónico (CHAPS), ácido 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfónico (CHAPSO), palmitoilisolecitina, dodecil-N-betaina y dodecil- $\beta$ -alanina.

Ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen octilglucósido, heptilglucósido, decanoil-M-metilglucamida, polioxietilendodecileter, polioxietilenoheptametilhexileter, polioxietilenoisooctilfenileter (serie TRITON (marca registrada) X), polioxietilenoisooctilfenileter, éster de ácido graso de polioxietileno, éster de ácido graso de sacarosa y éster de polioxietilensorbitol (serie TWEEN (marca registrada)). Entre estos tensioactivos, los tensioactivos no iónicos son particularmente preferidos. Estos tensioactivos se pueden usar solos o en combinación de dos o más especies. No se impone ninguna limitación concreta sobre la(s) cantidad(es) de tensioactivo(s) añadida(s) a la solución que contiene trombina, siempre que se incremente la estabilidad de la solución que contiene  $\alpha$ -trombina. Por ejemplo, la concentración del tensioactivo en la solución que contiene  $\alpha$ -trombina es, preferentemente, de 0,001 a 1 % en p/v, más preferentemente de 0,005 a 0,1 % en p/v.

Ejemplos específicos de las proteínas incluyen albúmina, gelatina y globulina. Estas proteínas se pueden usar solas o en combinación de dos o más especies. No se impone ninguna limitación concreta sobre la(s) cantidad(es) de proteínas añadida(s) a la solución que contiene trombina, siempre que se incremente la estabilidad de la solución que contiene  $\alpha$ -trombina. Por ejemplo, la concentración de la proteína en la solución que contiene  $\alpha$ -trombina es, preferentemente, de 0,05 a 10 % en p/v, más preferentemente de 0,1 a 5 % en p/v.

La solución que contiene  $\alpha$ -trombina usada en la presente invención puede además contener polisacáridos de alto peso molecular y/o polímeros sintéticos con el fin de potenciar la reproducibilidad de la medición, siempre y cuando no se impida el ensayo de fibrinógeno.

55 Ejemplos específicos de los polisacáridos de alto peso molecular incluyen dextrano 40, dextrano 70, dextrano 200.000, dextrano 500.000 y Ficoll. Estos polisacáridos de alto peso molecular se pueden usar solos o en combinación de dos o más especies. No se impone ninguna limitación concreta sobre la(s) cantidad(es) de los polisacáridos de alto peso molecular añadida(s) a la solución que contiene trombina, siempre que se potencie la reproducibilidad de la medición. Por ejemplo, la concentración del polisacárido de alto peso molecular en la solución que contiene trombina es, preferentemente, de 0,1 a 10 % en p/v, más preferentemente de 0,3 a 3 % en p/v.

60 Ejemplos específicos de los polímeros sintéticos incluyen alcohol polivinílico 500, alcohol polivinílico 1500, alcohol polivinílico 2000, polietilenglicol 1500, polietilenglicol 2000, polietilenglicol 4000, polietilenglicol 6000, polietilenglicol 8000, polietilenglicol 20000 y polivinilpirrolidona. Estos polímeros sintéticos se pueden usar solos o en combinación de dos o más especies. No se impone ninguna limitación concreta sobre la(s) cantidad(es) del/los polímero(s) sintético(s) añadida(s) a la solución que contiene trombina, siempre que se potencie la reproducibilidad de la medición. Por ejemplo, la concentración del polímero sintético en la solución que contiene trombina es de 0,1 a 10 % en p/v, preferentemente de 0,3 a 3 % en p/v.

A la solución que contiene trombina usada en la presente invención se pueden añadir conservantes adecuados, siempre que no se impida el ensayo de fibrinógeno. Ejemplos de los conservantes incluyen azida sódica, PROCLIN (marca registrada) 300, ciprofloxacino, ácido propiónico y benzoato sódico. Se pueden usar uno o más conservantes seleccionados. En caso necesario, se pueden añadir a la solución agentes estabilizantes empleados de forma habitual, tales como sales (p. ej., cloruro sódico), aminoácidos y sacáridos. No se impone ninguna limitación concreta sobre la(s) cantidad(es) de conservante(s) añadida(s) a la solución que contiene trombina, siempre que la(s) cantidad(es) entren dentro de un intervalo predeterminado. Por ejemplo, la concentración de PROCLIN (marca registrada) 300 en la solución que contiene trombina es de 0,001 a 1 % en p/v, preferentemente de 0,01 a 0,1 % p/v, que son las concentraciones con respecto al PROCLIN comercial (marca registrada) 300 con una concentración de 100 % en p/v.

El reactivo del ensayo de fibrinógeno contiene la solución que contiene  $\alpha$ -trombina mencionada anteriormente y puede además contener compuestos de uso habitual para el ensayo de fibrinógeno siempre que no se impida el ensayo de fibrinógeno.

El reactivo de ensayo de fibrinógeno líquido se puede usar como reactivo de ensayo del funcionamiento de la coagulación, en particular un reactivo de ensayo de fibrinógeno. En un procedimiento específico, una solución estándar de fibrinógeno se diluye, hasta una concentración predeterminada, con un tampón para dilución de muestras, y la solución estándar de fibrinógeno diluida de este modo y el reactivo de ensayo de fibrinógeno líquido se mezclan. El tiempo de coagulación se mide a 37 °C. A partir de la concentración de fibrinógeno y del tiempo de coagulación medido se obtiene una curva de coagulación. Un tiempo de coagulación de una muestra de ensayo se puede medir y convertir por medio de la curva de calibración, para obtener de este modo la concentración de fibrinógeno en la muestra de ensayo.

El reactivo de ensayo de fibrinógeno líquido de la presente invención, que contiene una solución que contiene trombina, se puede usar para determinar las actividades de una sustancia que inhibe la actividad de la trombina, por ejemplo actividad anti-trombina, actividad de hirudina y actividad de inhibición de la síntesis química.

El reactivo de ensayo de fibrinógeno líquido se puede proporcionar como un kit que incluye un reactivo de ensayo. En este caso, el kit puede contener además un tampón de dilución de la muestra para diluir una muestra y una solución estándar.

Ejemplos del tampón de dilución de la muestra incluyen tampón de Good, tales como MES, Bis-Tris, AOA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, OIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, Tricine, Bicine, TAPS, CHES, CAPSO y CAPS, y tampón barbiturato. Estos tampones de dilución de muestras se pueden usar de forma que el pH de la solución que contiene trombina y la concentración, como se ha descrito anteriormente, se ajusten para entrar dentro de los intervalos mencionados anteriormente cuando los tampones se añaden a la solución que contiene trombina.

## 40 Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación con detalle mediante Ejemplos.

### 45 Ejemplo de producción 1:

Separación/purificación de  $\alpha$ -trombina y  $\beta/\gamma$ -trombina

Una solución de trombina (50.000 unidades, preparadas mediante dilución con tampón fosfato 50 Mm (pH 7,0)) se adsorbió en S-Sepharosa (2,5 x 11 cm, producto de Pharmacia), se lavó con el mismo tampón y se eluyó con el mismo tampón que contiene NaCl 0,4M con gradiente lineal (NaCl de 0 a 0,4M (cada 300 ml)). La actividad trombina del eluato se determinó mediante el procedimiento del sustrato cromogénico para recuperar una mezcla de una fracción de  $\beta$ - y  $\gamma$ -trombina (en lo sucesivo denominado a  $\beta$ - y  $\gamma$ -trombina), que se eluyó a una fuerza iónica baja, y una fracción de  $\alpha$ -trombina, que se eluyó a una fuerza iónica alta.

Cada fracción de solución de trombina se adsorbió en Benzamidina-Sepharosa (2,1 x 6 cm, producto de Pharmacia), se lavó con el mismo tampón que contiene NaCl 0,5M y se eluyó con el mismo tampón que contiene benzamidina 0,1M y NaCl 0,5M con un gradiente lineal (benzamidina de 0 a 0,1M (cada 100 ml)), para recuperar de este modo  $\alpha$ -trombina purificada (aproximadamente 30.000 unidades) y  $\beta/\gamma$ -trombina purificada (aproximadamente 10.000 unidades). Cada una de las soluciones de trombina purificadas recuperadas de este modo se sometió a diálisis contra NaCl 0,1M NaCl-Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) y se usó en los estudios posteriores. La actividad de trombina se determinó mediante el procedimiento del sustrato cromogénico. Específicamente, cada solución que contiene trombina (200  $\mu$ l), que se había diluido 500 veces con el reactivo 1 (Tris 100 mM, citrato 3Na 50 mM, BSA al 0,05 % (pH 7,4)), se mezcló con el reactivo 2 (S-2283: 1 mg/ml) (200  $\mu$ l) y se dejó reaccionar la mezcla a 37 °C durante 10 minutos. A la mezcla de reacción se añadió ácido cítrico al 2 % (1 ml) y se midió la absorbancia a 405 nm. La medición obtenida a través del procedimiento del sustrato cromogénico se convirtió en actividad de trombina en base a la medición a partir de la trombina estándar (Farmacopea de Japón). Como resultado, se descubrió que la solución

de  $\alpha$ -trombina tenía una concentración de 1,238 unidades/ml y se descubrió que la solución de  $\beta/\gamma$ -trombina purificada tenía una concentración de 677 unidades/ml.

### Ejemplo de producción 2:

5 Ensayo de pureza de trombina (densitometría)

10 Cada una de las  $\alpha$ -trombina y  $\beta/\gamma$ -trombina purificadas se sometió a electroforesis en gel de SDS 10-20%-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras mediante el método de Laemmli. Tras la tinción proteica con CBB, el gel se destiñó suficientemente. La intensidad de la coloración de cada banda se midió mediante un densitómetro (Kodak IS440CF).

15 Como se muestra en la Tabla 1 y la Figura 1, se encontró que la  $\alpha$ -trombina purificada tenía una pureza de aproximadamente el 95 % (que contiene aproximadamente un 5 % de  $\beta/\gamma$ -trombina) y se descubrió que la  $\beta/\gamma$ -trombina purificada tenía una pureza de aproximadamente 80 % (que contiene aproximadamente un 20 % de  $\alpha$ -trombina). En la Fig. 1, A indica una banda atribuida a la  $\alpha$ -trombina y B indica una banda atribuida a las  $\beta/\gamma$ -trombinas.

[Tabla 1]

20

	Intensidad		Contenido relativo (%)	
	A	B	A	B
$\alpha$ -trombina purificada	74,04	4,195	94,6	504
$\beta/\gamma$ -trombina purificada	15,037	59,046	20,3	79,7

### Ejemplo 1:

#### Preparación de soluciones que contienen trombina en las condiciones 1 a 5

25

Cada una de las soluciones que contienen trombina en las condiciones 1-5 fue una solución (pH 6,3) preparada a partir de tampón MES 50 mM que contiene  $\alpha$ -trombina (100 unidades/ml), cloruro sódico 150 mM, PROCLIN 0,05 % (marca registrada) 300 y  $\beta/\gamma$ -trombina en una cantidad para conseguir la actividad relativa como se cita más adelante. Las soluciones se prepararon a partir de  $\alpha$ -trombina purificada y  $\beta/\gamma$ -trombina purificada.

30

Condición 1: La actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina con respecto a la actividad de la trombina total era del 5 %

Condición 2: La actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina con respecto a la actividad de la trombina total era del 10 %

Condición 3: La actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina con respecto a la actividad de la trombina total era del 15 %

Condición 4: La actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina con respecto a la actividad de la trombina total era del 20 %

35

Condición 5: La actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina con respecto a la actividad de la trombina total era del 50 %

### Ejemplo 2:

Estabilidad en el contenido de  $\alpha$ -trombina

40

Cada una de las soluciones que contienen trombina en las condiciones 1-5 se mantuvo a 37 °C durante 0, 1 o 2 semanas, y se determinó el porcentaje restante del contenido en  $\alpha$ -trombina. El contenido en  $\alpha$ -trombina se midió mediante el ensayo de pureza de la trombina, como se describe en el Ejemplo de Producción 2.

45 Como se muestra en la Tabla 2 y la Figura 2, se encontró que el porcentaje restante del contenido en  $\alpha$ -trombina después del ensayo acelerado (37 °C) disminuía a medida que aumentaba la actividad relativa de la  $\beta/\gamma$ -trombina. La solución que contiene trombina (condición 5) que tiene una actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina del 50 % exhibió un porcentaje restante del contenido en  $\alpha$ -trombina del 50 % tras almacenamiento a 37 °C durante dos semanas, mientras que la solución que contiene trombina (condición 4) que tiene una actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina del 20 % exhibió un porcentaje restante del contenido en  $\alpha$ -trombina tan elevado como del 81 % tras almacenamiento a 37 °C durante dos semanas. Por tanto, cuanto menor es la cantidad de  $\beta/\gamma$ -trombina copresente (es decir, cuando mayor es la actividad relativa de  $\alpha$ -trombina), mayor porcentaje de  $\alpha$ -trombina permanecía.

50

[Tabla 2]

Porcentaje restante de contenido en $\alpha$ -trombina tras el ensayo acelerado						
		Cond. 1	Cond. 2	Cond. 3	Cond. 4	Cond. 5
(contenido en $\beta/\gamma$ -trombina/trombina total)		(%) 5	10	15	20	50
Porcentaje restante de contenido en $\alpha$ -trombina (%)	Periodo de almacenamiento (37 °C)					
	37 °C, día 0	100	100	100	100	100
	37 °C, 1 semana	96,7	97,1	96,6	94,2	78,9
	37 °C, 2 semanas	106,2	89,7	96,7	81,1	50,4

5 Como se muestra en la Fig. 1, la actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina respecto a la actividad de trombina total es inversamente proporcional al porcentaje restante del contenido en  $\alpha$ -trombina. Por tanto, cuando la actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina es del 30 % (es decir, la actividad relativa de  $\alpha$ -trombina respecto a la actividad de trombina total es del 70 %), se ha estimado que el porcentaje restante del contenido en  $\alpha$ -trombina tras dos semanas de almacenamiento a 37 °C es del 70 % o superior. El resultado indica que el contenido en  $\alpha$ -trombina con respecto a la trombina total en una solución que contiene trombina es del 70 % o superior, preferentemente del 80 % o superior, más preferentemente del 90 % o superior.

10 El resultado también indica que, todavía más preferentemente, el contenido en  $\alpha$ -trombina va a ser del 70 % o superior, y el contenido  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina va a ser inferior al 30 % con respecto a la cantidad de trombina total en una solución que contiene trombina, todavía más preferentemente, del 80 % o superior e inferior al 20 %, respectivamente, y particularmente preferentemente, del 90 % o superior y menor del 10 %, respectivamente.

### Ejemplo 3:

Estabilidad en la actividad de trombina

20 De un modo similar al Ejemplo 1, cada una de las soluciones que contienen trombina en las condiciones 1-5 se preparó y se mantuvo a 37 °C durante 0, 1 o 2 semanas, y se determinó el porcentaje restante de actividad de trombina de la actividad de trombina medida mediante el procedimiento del sustrato cromogénico.

25 La actividad se determinó mediante el procedimiento del sustrato cromogénico, como se describe en el Ejemplo de Producción 1.

30 Como se muestra en la Tabla 3 y la Figura 2, la solución que contiene trombina (condición 5) que tiene una actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina del 50 % exhibió un porcentaje restante de la actividad de trombina del 20 % o menor tras almacenamiento a 37 °C durante dos semanas, mientras que la solución que contiene trombina (condición 4) que tiene una actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina del 20 % exhibió un porcentaje restante de actividad de trombina tan elevado como de aproximadamente un 60% tras almacenamiento a 37 °C durante dos semanas. Por tanto, cuanto menor es la actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina (es decir, cuando mayor es la actividad relativa de  $\alpha$ -trombina), mayor porcentaje de actividad de trombina permanecía tras almacenamiento a 37 °C durante dos semanas.

[Tabla 3]

Porcentaje restante de actividad de trombina tras el ensayo acelerado (37 °C)						
		Cond. 1	Cond. 2	Cond. 3	Cond. 4	Cond. 5
(contenido en $\beta/\gamma$ -trombina/trombina total)		(%) 5	10	15	20	50
Porcentaje restante de contenido en $\alpha$ -trombina (%)	Periodo de almacenamiento (37 °C)					
	37 °C, día 0	100	100	100	100	100
	37 °C, 1 semana	86,8	79,2	73,04	62,1	39,2
	37 °C, 2 semanas	79,2	74,04	68,8	60,2	18,6

**Ejemplo 4:**

Estabilidad en la actividad de coagulación de las soluciones que contienen  $\alpha$ -trombina

- 5 Cada una de las soluciones que contienen  $\alpha$ -trombina en las condiciones 1-5 que se habían preparado en el ejemplo 2 y se mantuvo a 37 °C durante 0, 1 o 2 semanas se sometió a un ensayo de coagulación usando muestras de plasma humano (muestra 1 y muestra 2). En el ensayo de coagulación, una muestra de plasma se diluyó 10 veces con una solución de dilución de muestras (tampón TC, producto de Sysmex Corporation), y cada solución que contiene trombina (50  $\mu$ l) se añadió a la solución de plasma (100  $\mu$ l). El tiempo de coagulación se midió por medio de
- 10 Coagrex 800 (producto de Sysmex Corporation). Los resultados del ensayo en la muestra 1 se muestran en la Tabla 4 y la Fig. 4 y los de la muestra 2 se muestran en la Tabla 5 y la Fig. 4. En las Fig. 4 y 5, se representa el tiempo de coagulación por un tiempo relativo (%) con respecto al tiempo de coagulación del 100 % la semana 0.

[Tabla 4]

15

Muestra 1: Tiempo de coagulación (s) de la muestra 1 tras el ensayo acelerado (37 °C) (Muestra 1: 290 mg/dl)						
		Cond. 1	Cond. 2	Cond. 3	Cond. 4	Cond. 5
(contenido en $\beta/\gamma$ -trombina/trombina total) (%)		5	10	15	20	50
Tiempo de coagulación (s)	Periodo de almacenamiento (37 °C)					
	Día 0	13,6	13,8	13,7	14,5	14,6
	1 semana	13,7	13,5	13,9	1504	16,7
	2 semanas	13,9	14,1	1404	15,6	18,0

[Tabla 5]

Muestra 2: Tiempo de coagulación (s) de la muestra 2 tras el ensayo acelerado (37 °C) (Muestra 2: 145 mg/dl)						
		Cond. 1	Cond. 2	Cond. 3	Cond. 4	Cond. 5
(contenido en $\beta/\gamma$ -trombina/trombina total) (%)		5	10	15	20	50
Tiempo de coagulación (s)	Periodo de almacenamiento (37 °C)					
	Día 0	23,4	24,2	23,9	2504	25,3
	1 semana	24,6	2404	24,3	26,0	28,5
	2 semanas	25,0	25,2	25,3	26,6	31,0

- 20 Como se muestra en las figuras 4 y 5, la solución que contiene trombina (condición 5) que tiene una actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina del 50 % exhibió un tiempo de coagulación relativo con respecto al tiempo de coagulación inicial superior al 120 % tras almacenamiento a 37 °C durante dos semanas, mientras que las soluciones que contienen trombina (condiciones 1 a 4) que tiene una actividad relativa de  $\beta/\gamma$ -trombina del 20 % o menor exhibieron un tiempo de coagulación relativo menor de 100%. Por tanto, se ha demostrado que la solución que contiene
- 25 trombina de la presente invención es estable en solución y, por consiguiente, útil para un reactivo de ensayo de fibrinógeno líquido.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para estabilizar  $\alpha$ -trombina en una solución que contiene trombina, que comprende ajustar el porcentaje de  $\alpha$ -trombina al 70 % o mayor con respecto a la cantidad de trombina total en la solución que contiene trombina.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el contenido en  $\beta$ - y/o  $\gamma$ -trombina con respecto a la cantidad de trombina total en la solución que contiene trombina es inferior al 30 %.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la solución que contiene trombina tiene un pH de 4 a 9.

Fig. 1

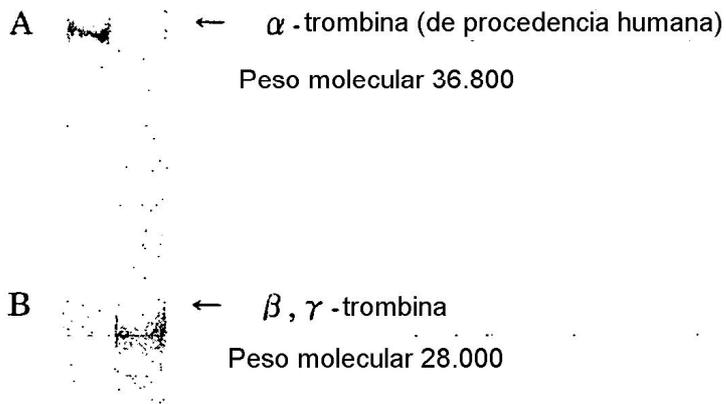


Fig. 2

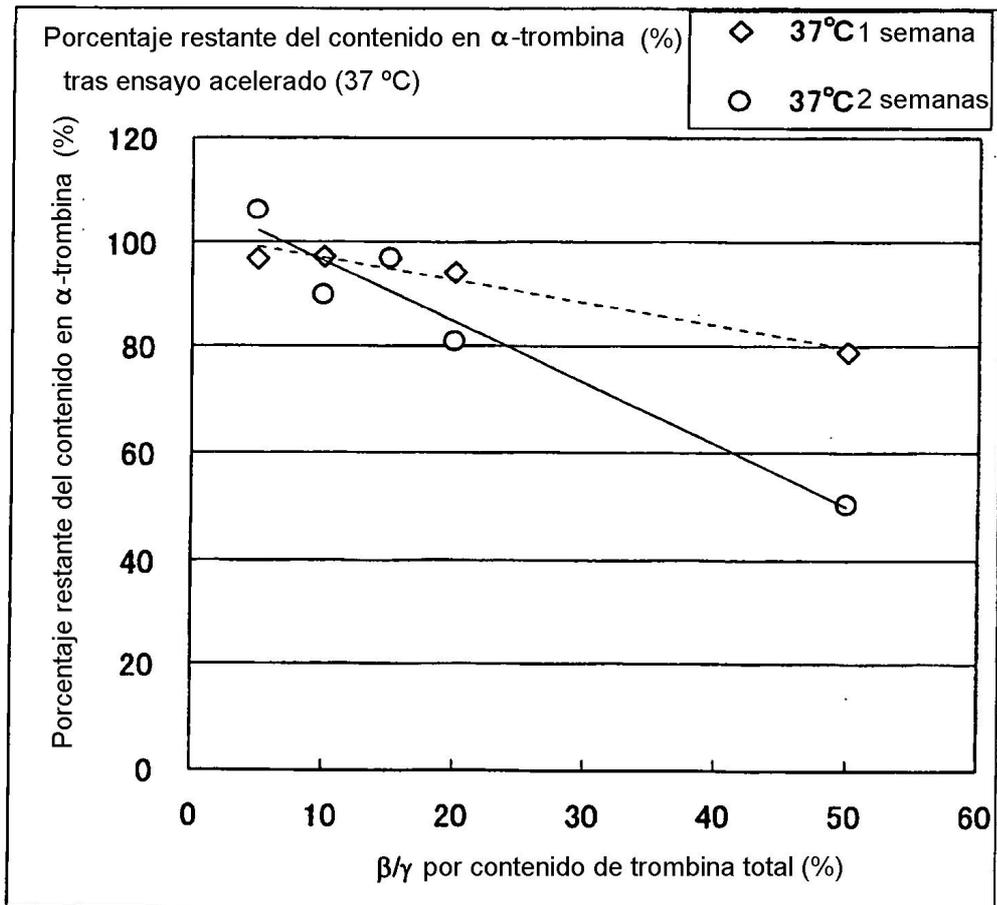


Fig. 3

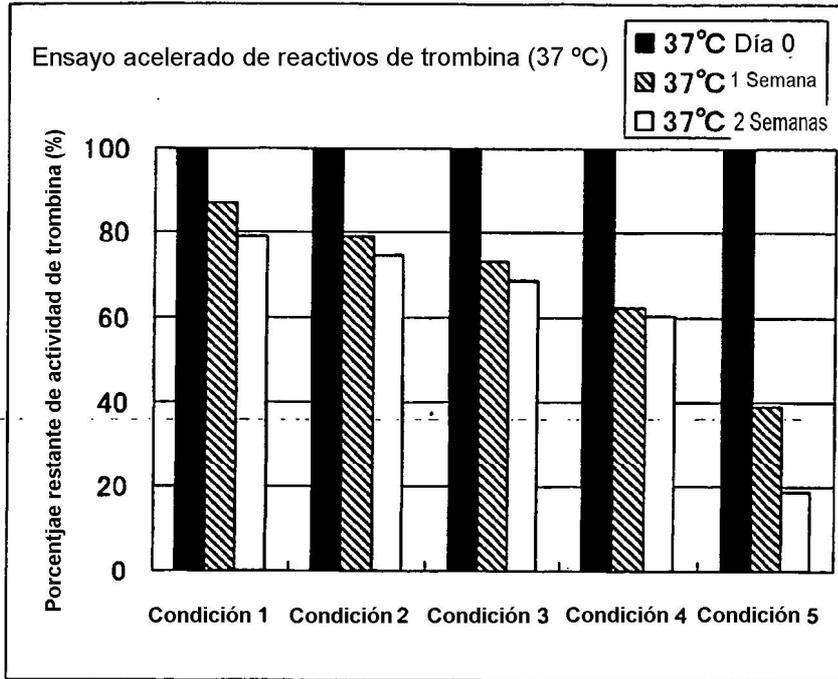


Fig. 4

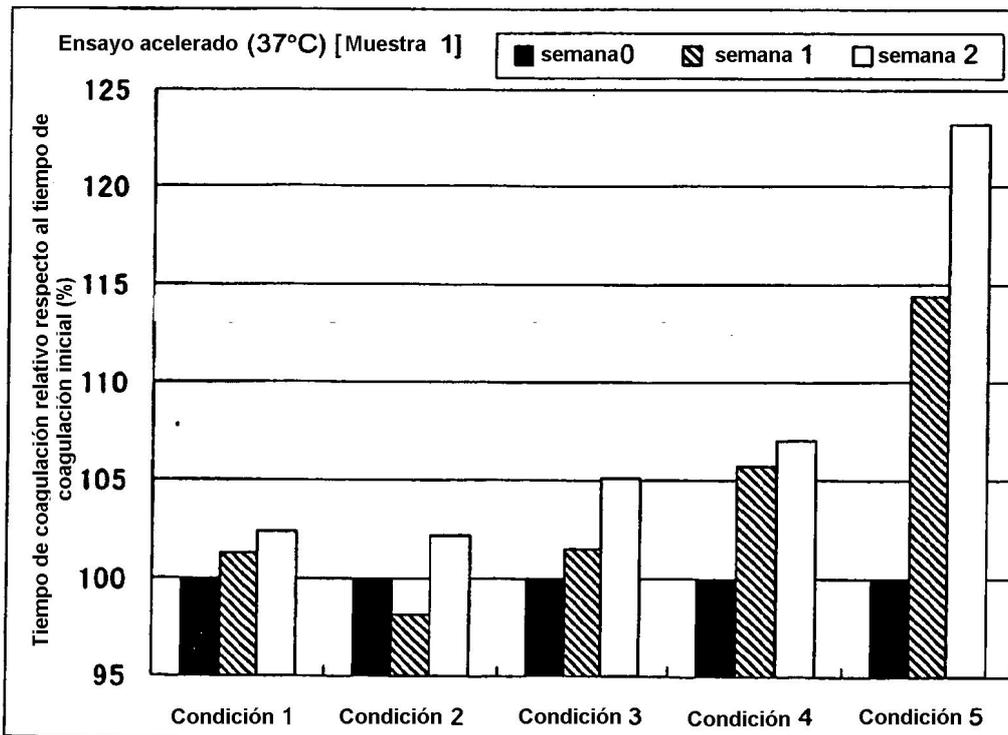


Fig. 5

