

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 319**

51 Int. Cl.:
G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08162829 .9**
96 Fecha de presentación: **22.08.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2031402**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54 Título: **Método para medir el tiempo de coagulación de una muestra de sangre**

30 Prioridad:
31.08.2007 JP 2007226463

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.08.2012

73 Titular/es:
SYSMEX CORPORATION
5-1, WAKINOHAMA-KAIGANDORI 1-CHOME,
CHUO-KU
KOBE-SHI, HYOGO 651-0073, JP

72 Inventor/es:
Hoshiko, Susumu y
Kobayashi, Katsushi

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 386 319 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

Método para medir el tiempo de coagulación de una muestra de sangre

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al uso de un reactivo y un método para medir el tiempo de coagulación de una muestra de sangre.

10 Antecedentes

La coagulación sanguínea es la reacción en que están implicados diversos factores de coagulación sanguínea de la sangre. Mediante esta reacción, el fibrinógeno de la sangre se convierte finalmente en fibrina. El tiempo requerido para la coagulación sanguínea (a partir de ahora en este documento mencionado a veces como tiempo de coagulación sanguínea) puede medirse para examinar, por ejemplo, carencias y anormalidades de diversos factores de coagulación sanguínea. En base al tiempo de coagulación sanguínea, también puede examinarse la tendencia hemorrágica de un paciente.

Habitualmente, se estima que la coagulación sanguínea sucede a través de las siguientes vías (véase la FIG. 1). Es decir, la primera vía es una vía llamada coagulación extrínseca (factor tisular). Partiendo de la liberación de tromboplastina tisular (también llamada factor tisular) por las células epidérmicas o similares, se activa el factor de coagulación VII mediante la tromboplastina tisular. Este factor de coagulación VII activado activa el factor de coagulación X. Éste activa el factor de coagulación V y el factor II, y finalmente el fibrinógeno se convierte en fibrina. El tiempo de coagulación sanguínea en esta vía puede medirse mediante un método de medición del tiempo de protrombina (PT).

La segunda vía es una vía llamada coagulación intrínseca (factor de contacto). En la vía de coagulación intrínseca, el factor de coagulación XII se activa, por ejemplo, por contacto con una superficie cargada negativamente de una materia foránea tal como colágeno. A su vez, el factor XII activado activa el factor XI. El factor XI activado a su vez activa el factor IX, y el factor IX activado activa el factor X con una acción colaborativa de iones calcio y el factor VIII. Después, se activan secuencialmente el factor V y el factor II, y finalmente el fibrinógeno se convierte en fibrina. El tiempo de coagulación sanguínea en esta vía puede medirse por un método de tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT).

El calcio y los fosfolípidos (PL) están implicados en ambas vías.

Los métodos conocidos para medir el tiempo de coagulación sanguínea incluyen un método de medición óptica que comprende mezclar una muestra de sangre que contiene factores de coagulación con un reactivo que contiene fosfolípido (PL) y calcio para causar la coagulación sanguínea y detectar la formación de fibrina como un cambio óptico. El método de medición de PT o el método de medición de APTT es un tipo de método de medición óptica.

En dicho método de medición óptica, el cambio óptico habitualmente es muy bajo después de añadir un reactivo para medir la coagulación sanguínea a una muestra de sangre para iniciar la reacción de coagulación sanguínea hasta que la reacción procede a formar fibrina. Después, sucede un rápido cambio óptico dentro de un corto tiempo después de la formación de fibrina.

Sin embargo, el calcio contenido en un reactivo para medir la coagulación sanguínea a veces puede reaccionar con una sustancia diferente de los factores de coagulación sanguínea contenidos en una muestra de sangre para generar aglutinación. La sustancia diferente a los factores de coagulación sanguínea que reacciona con el calcio incluye, por ejemplo, proteína C reactiva (CRP) y componentes lipídicos (por ejemplo, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL)) contenidos en una muestra de sangre. Cuando se genera la aglutinación mediante dicha reacción, la aglutinación se detecta como un cambio óptico en una fase inicial de la medición, y el cambio óptico a veces puede reconocerse erróneamente como coagulación sanguínea (Toh, CH et al., Blood, 100(7), pág. 2522-2529 (2002)).

El documento US2003/138962 describe un método para detectar una anomalía en una reacción temprana en medición óptica de la coagulación sanguínea estableciendo al menos un punto de control o región de control desde el inicio de la medición hasta el final de la reacción de coagulación.

Sin embargo, no ha habido un reactivo capaz de medir de forma precisa el tiempo de coagulación sanguínea suprimiendo la generación de un cambio óptico en una fase inicial de la medición que se ha descrito anteriormente.

Sumario

El reactivo para medir el tiempo de coagulación comprende un quelante de calcio. Este quelante de calcio puede interferir con la reacción entre el calcio y una sustancia diferente de un factor de coagulación en la muestra de

sangre, sin interferir esto sustancialmente con la reacción de coagulación.

5 El kit reactivo para medir el tiempo de coagulación comprende un primero y un segundo reactivos. El primer reactivo comprende al menos uno seleccionado entre el grupo compuesto por tromboplastina parcial, tromboplastina tisular, y complejo de factor tisular y fosfolípido. El segundo reactivo comprende calcio. En el primer reactivo, el segundo reactivo o ambos, se incluye un quelante de calcio. Este quelante de calcio puede interferir con la reacción entre el calcio y una sustancia diferente de un factor de coagulación en la muestra de sangre, sin interferir esto sustancialmente con la reacción de coagulación.

10 El método para medir el tiempo de coagulación de acuerdo con la presente invención comprende una etapa de contacto y una etapa de medición. La etapa de contacto es poner en contacto la muestra de sangre, calcio, y un compuesto seleccionado entre el grupo compuesto por tromboplastina parcial, tromboplastina tisular, y complejo de factor tisular y fosfolípido, en presencia de un quelante de calcio. Este quelante de calcio puede interferir con la reacción entre el calcio y una sustancia diferente de un factor de coagulación en la muestra de sangre, sin interferir esto sustancialmente con la reacción de coagulación. La etapa de medición es medir el tiempo de coagulación de la muestra de sangre.

20 El uso del reactivo para medir la coagulación sanguínea y el método para medir el tiempo de coagulación sanguínea de acuerdo con la presente invención pueden usarse para medir el tiempo de coagulación sanguínea suprimiendo la generación de un cambio óptico en una fase inicial de la medición. Por consiguiente, la coagulación sanguínea puede medirse de forma más precisa que por métodos convencionales para medir el tiempo de coagulación sanguínea.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es un diagrama que muestra dos vías principales de coagulación sanguínea.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de referencia 1.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de referencia 2.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados del experimento 1.

30 **Descripción de las realizaciones preferidas**

35 La muestra de sangre usada en la medición de la coagulación sanguínea se prepara habitualmente añadiendo un anticoagulante, tal como citrato sódico, a la sangre (sangre completa o plasma) recogida de un paciente. Como el anticoagulante contenido en la muestra de sangre influye en la reacción en la medición de la coagulación sanguínea, se elimina la influencia del anticoagulante permitiendo que esté habitualmente presente una gran cantidad de calcio en el sistema de medición de la coagulación sanguínea para que el calcio se una al anticoagulante, interfiriendo de este modo con la acción del anticoagulante.

40 El calcio también es un componente esencial para permitir que proceda la reacción de coagulación sanguínea como se muestra en la FIG. 1. Es decir, el calcio presente en exceso en el sistema de medición de la coagulación sanguínea, junto con el fosfolípido (PL) que se permite que esté presente en el sistema de medición de la coagulación sanguínea, reacciona con los factores de coagulación sanguínea en la muestra de sangre activándolos de este modo de modo que proceda la reacción de coagulación sanguínea.

45 Un exceso de calcio que no reaccione con el anticoagulante o no se use en la reacción de coagulación sanguínea se aglutina reaccionando con sustancias en la muestra de sangre tales como partículas lipídicas de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y proteína C reactiva (CRP) u otras diferentes de los factores de coagulación sanguínea. Esta aglutinación causa un cambio óptico en una fase inicial de la medición. En la medición óptica, el cambio óptico causado por esta aglutinación y el cambio óptico por la reacción de coagulación sanguínea difícilmente se distinguen entre sí como se ha descrito anteriormente. Se deduce que cuando sucede la aglutinación como se ha descrito anteriormente, existe una posibilidad de que el tiempo de coagulación sanguínea no pueda medirse de forma precisa.

55 Los presentes inventores acreditaron la observación del calcio como una de las sustancias causantes de generar un cambio óptico en una fase inicial de la medición. Entonces, los inventores pensaron que un cambio óptico en una fase inicial de la medición puede suprimirse quelando el calcio con un quelante para evitar que el calcio reaccione con otras sustancias (es decir, sustancias diferentes de los factores de coagulación sanguínea en una muestra de sangre) causando un cambio óptico en una fase inicial de la medición. Sin embargo, el calcio tiene la tarea de reaccionar con un anticoagulante para impedir la acción del anticoagulante y tiene la tarea de reaccionar con los factores de coagulación sanguínea en una muestra de sangre para promover la reacción de coagulación sanguínea, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, la quelación completa del calcio con un quelante podría conducir al fracaso del calcio en reaccionar con un anticoagulante o con los factores de coagulación sanguínea en una muestra de sangre. En consecuencia, los inventores descubrieron que cuando se selecciona y usa un quelante de calcio adecuado que tiene potencia más débil en su unión al calcio que el anticoagulante y los factores de coagulación sanguínea, puede suprimirse un cambio óptico en una fase inicial de la medición para medir el tiempo de

coagulación sanguínea, y de este modo se completó la presente invención.

El reactivo para medir la coagulación sanguínea es un reactivo usado para la medición del tiempo de coagulación sanguínea, y contiene un quelante de calcio. Este quelante de calcio interfiere con la reacción entre el calcio y sustancias diferentes de los factores de coagulación en una muestra de sangre, pero no interfiere sustancialmente con la reacción de coagulación sanguínea. El reactivo para medir la coagulación sanguínea puede contener adicionalmente otros componentes tales como calcio y fosfolípido usados en la medición del tiempo de coagulación sanguínea de modo que puede utilizarse en la medición de la coagulación sanguínea mezclando el reactivo solo con una muestra de sangre. El reactivo para medir la coagulación sanguínea puede ser un kit reactivo que se puede utilizar en la medición de la coagulación sanguínea, que está combinado con una pluralidad de reactivos que contienen otros componentes usados en la medición del tiempo de coagulación sanguínea.

Se conocen diversos métodos para medir la coagulación sanguínea. El reactivo para medir la coagulación sanguínea puede usarse de forma particularmente preferible en un método de medición óptica de la coagulación sanguínea para detectar la reacción de coagulación sanguínea midiendo información óptica tal como un cambio en la luz transmitida y un cambio en la luz dispersada. El método de medición óptica de la coagulación sanguínea incluye, por ejemplo, un método de medición del tiempo de protrombina (PT), un método de medición del tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT), un método de medición de anticoagulante lúpico (LA), un trombotest, un hepaplastintest, y un método de cuantificación del factor de coagulación.

Por ejemplo, el método de medición del APTT conocido en la técnica es un método que usa fosfolípido (también llamado tromboplastina parcial), un reactivo APTT que contiene un activador, y una solución de calcio. Específicamente, el reactivo APTT se mezcla con una muestra de sangre (plasma), y se incuba la mezcla resultante. Después de la incubación, la mezcla se mezcla con la solución de calcio para medir el tiempo de coagulación. El activador usado en el método de medición del APTT incluye ácido elálgico, caolín, celite etc.

El reactivo para medir la coagulación sanguínea, cuando se usa en el método de medición del APTT, por ejemplo, puede ser un reactivo independiente diferente del reactivo APTT o la solución de calcio, puede ser un reactivo que contiene el quelante junto con fosfolípido (es decir, un reactivo que tiene el quelante añadido al reactivo APTT conocido en la técnica), o puede ser un reactivo que contiene tanto el quelante como calcio.

El método de medición de PT es un método que usa un complejo factor tisular/fosfolípido o tromboplastina tisular y un reactivo PT que contiene calcio. Específicamente, este método implica mezclar el reactivo PT con una muestra de sangre (plasma) para medir el tiempo de coagulación.

El reactivo para medir la coagulación sanguínea, cuando se usa en el método de medición del PT, por ejemplo, puede ser un reactivo independiente diferente del reactivo PT o puede ser un reactivo que contiene el quelante junto con fosfolípido y calcio (es decir, un reactivo que tiene el quelante añadido al reactivo PT conocido en la técnica). En el método de medición del PT, un complejo factor tisular/fosfolípido o tromboplastina tisular, y el calcio, pueden ser reactivos diferentes. En este caso, el reactivo para medir la coagulación sanguínea puede ser un reactivo que contiene tanto el quelante como fosfolípido (es decir, un reactivo que tiene el quelante añadido a un reactivo que contiene un complejo factor tisular/fosfolípido o tromboplastina tisular) o puede ser un reactivo que contiene tanto el quelante como calcio.

El método de medición del LA es un método para detectar un anticuerpo anti-fosfolípido en una muestra de sangre por un ensayo de coagulación. Se conocen diversos métodos para medir el LA e incluyen, por ejemplo, un método que usa dos reactivos diferentes en la concentración de fosfolípido. Específicamente, el método de medición del LA es un método que implica medir el tiempo de coagulación sanguínea de una muestra de sangre usando dos reactivos diferentes en la concentración de fosfolípido y después usando una diferencia o proporción entre los dos tiempos de coagulación sanguínea determinados para detectar un anticuerpo anti-fosfolípido en la muestra de sangre. En el método de medición del LA, el método para medir el tiempo de coagulación varía dependiendo del tipo de reactivo. Por ejemplo, cuando el reactivo usado en el método de medición del LA contiene calcio y un activador, el tiempo de coagulación se mide en base al principio de medición del APTT. Cuando el reactivo usado en la medición del LA contiene calcio y un veneno de serpiente, el tiempo de coagulación se mide en base al principio del tiempo de medición de veneno de serpiente. Cuando el reactivo usado en la medición del LA contiene calcio y un complejo factor tisular/fosfolípido o tromboplastina tisular, el tiempo de coagulación se mide en base al principio de medición del PT.

El trombotest es uno de los métodos para detectar una anomalía en la actividad del factor de coagulación dependiente de vitamina K. El trombotest es un método en el que se añade un reactivo que contiene tromboplastina tisular obtenida de cerebro bovino, plasma bovino adsorbido sobre sulfato de bario, y calcio a sangre completa o plasma como muestra para medir el tiempo de coagulación. En el trombotest, el calcio y otra composición pueden ser reactivos diferentes.

El hepaplastintest es un método para detectar una anomalía en la actividad del factor de coagulación dependiente de vitamina K. El hepaplastintest se usa para medir el tiempo de coagulación esencialmente del mismo

modo que en el trombotest excepto en que se usa tromboplastina tisular obtenida de cerebro de conejo en lugar de tromboplastina tisular obtenida de cerebro bovino.

5 El método de cuantificación del factor de coagulación es un método para cuantificar los factores de coagulación individuales usando el método de medición del APTT o el método de medición del PT. Específicamente, este método implica añadir plasma deficiente en solamente un factor de coagulación objetivo al plasma como muestra y medir el tiempo de coagulación usando el principio de medición del método de medición del APTT o el método de medición del PT. Cuando el factor de coagulación objetivo es un factor de coagulación que participa en la coagulación intrínseca, se usa el reactivo usado en el método de medición del APTT. Cuando el factor de coagulación objetivo es un factor de coagulación que participa en la coagulación extrínseca o en la coagulación normal, se usa el reactivo usado en el método de medición del PT.

15 El reactivo para medir la coagulación sanguínea puede ser un reactivo que contiene el quelante de calcio junto con componentes contenidos en un reactivo convencionalmente conocido usado en cada uno de los métodos de medición o puede ser un reactivo independiente que contiene quelante de calcio usado en combinación con un reactivo convencionalmente conocido usado en cada uno de los métodos de medición.

20 El quelante usado en el reactivo para medir la coagulación sanguínea es preferiblemente uno que tenga una constante de estabilidad quelante inferior que la del anticoagulante contenido en una muestra de sangre. Específicamente, el quelante es preferiblemente uno que tenga una constante de estabilidad quelante inferior para el calcio que la del ácido cítrico o su sal usada generalmente como anticoagulante. El quelante que tiene dicha constante de estabilidad quelante tiene una capacidad de unión a calcio más débil que la del anticoagulante en una muestra de sangre o que la del factor de coagulación sanguínea.

25 En este memoria descriptiva, "constante de estabilidad quelante para el calcio" es un valor calculado como $\log K_{MA}$ determinado por un método descrito en una tabla en las pág. 5 a 10 en un apéndice a la referencia "Kinzoku Chelate (Metal Chelate) III, Primera Edición, ed. Takeichi Sakaguchi y Keihei Ueno".

30 Una constante de estabilidad quelante mayor para el calcio es indicativa de una más fácil quelación con el calcio.

La constante de estabilidad quelante del ácido cítrico para el calcio es de 3,16 de acuerdo con la referencia "Kinzoku Chelate (Metal Chelate) III, Primera Edición, ed. Takeichi Sakaguchi y Keihei Ueno".

35 Específicamente, la constante de estabilidad quelante del quelante para el calcio es preferiblemente de 3 o menos, más preferiblemente de 2,5 o menos.

40 Los ejemplos del quelante que tiene una constante de estabilidad quelante de 3 o menos para el calcio incluyen ácidos orgánicos tales como ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido citracónico, ácido itacónico, ácido tricarbálico, ácido propano-1,1,2,3-tetracarboxílico, ácido butano-1,2,3,4-tetracarboxílico, ácido glicólico, ácido tioglicólico, ácido tartárico, ácido isocítrico, ácido pirúvico y ácido oxaloacético, y sales de los mismos. Estos quelantes pueden usarse individualmente o en una combinación de dos o más de los mismos.

45 El quelante es preferiblemente al menos un miembro seleccionado entre el grupo compuesto por ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido láctico, y sales de los mismos. De acuerdo con al referencia "Kinzoku Chelate (Metal Chelate) III, Primera Edición, ed. Takeichi Sakaguchi y Keihei Ueno", las constantes de estabilidad quelante de estos quelantes preferibles para el calcio son de 1,10 para el ácido maleico, de 2,24 para el ácido málico, de 2,49 para el ácido malónico, y de 1,42 para el ácido láctico.

50 Cuando el quelante es una sal del ácido orgánico, la sal puede ser una sal con un metal alcalino tal como sodio o potasio o un metal alcalino-térreo.

55 El quelante tiene una capacidad de unión a calcio más débil que la del anticoagulante en una muestra de sangre o que la del factor de coagulación sanguínea. Por consiguiente, el quelante no interfiere con la reacción entre el calcio y el anticoagulante o la reacción de coagulación sanguínea, y evita que el exceso de calcio en el sistema de medición de la coagulación sanguínea se una a sustancias tales como VLDL diferentes de los factores de coagulación sanguínea en una muestra de sangre, posibilitando de este modo la supresión de un cambio óptico en una fase inicial de la medición.

60 La concentración del quelante en el reactivo para medir la coagulación sanguínea puede establecerse adecuadamente dependiendo del tipo de método de medición de la coagulación sanguínea que usa el reactivo para medir la coagulación sanguínea y el tipo de quelante. Por ejemplo, cuando el quelante está contenido en la solución de calcio usada en el método de medición del APTT, la concentración del quelante en la solución de calcio es preferiblemente de 20 a 120 mM, más preferiblemente de 40 a 100 mM.

65

La concentración de calcio en la solución de calcio usada en la medición del APTT puede estar habitualmente en el intervalo de 20 a 25 mM. Por consiguiente, la concentración del quelante en la solución de calcio se establece preferiblemente de 0,8 a 6 veces, más preferiblemente de 1,6 a 5 veces, relativa a la concentración de calcio.

5 Preferiblemente, el reactivo para medir la coagulación sanguínea contiene adicionalmente fosfolípido.

10 El fosfolípido es preferiblemente uno que se usa como componente usado en la coagulación sanguínea en un reactivo convencional para medir la coagulación sanguínea. No está particularmente limitada la cadena lateral del ácido graso del fosfolípido, pero es preferiblemente ácido palmítico, ácido oleico o ácido esteárico. El fosfolípido incluye fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, y similares. El fosfolípido puede ser un fosfolípido natural obtenido de cerebro bovino, cerebro de conejo, placenta humana, o semilla de soja o puede prepararse por recombinación genética.

15 La concentración del fosfolípido en el reactivo para medir la coagulación sanguínea puede establecerse adecuadamente dependiendo del tipo de método de medición de la coagulación sanguínea que usa el reactivo para medir la coagulación sanguínea. Cuando el fosfolípido se usa en el método de medición del APTT, por ejemplo, la concentración del fosfolípido en el reactivo APTT convencional puede ser de 20 a 200 µg/ml. Cuando el fosfolípido se usa en el método de medición del PT, la concentración del fosfolípido en el reactivo PT convencional puede ser de 10 a 300 µg/ml.

20 Preferiblemente, el reactivo para medir la coagulación sanguínea contiene adicionalmente calcio. El calcio está preferiblemente en forma de una sal con un ácido inorgánico. Dicha sal de calcio incluye cloruro de calcio. Las sales de calcio diferentes a sales de calcio con un ácido inorgánico incluyen lactato de calcio.

25 La concentración de calcio en el reactivo para medir la coagulación sanguínea puede establecerse adecuadamente dependiendo del tipo de método de medición de la coagulación sanguínea que usa el reactivo para medir la coagulación sanguínea. En el caso del método de medición del APTT, por ejemplo, la concentración de calcio en la solución de calcio usada en el método convencional de medición del APTT puede ser de aproximadamente 20 a 25 mM. En el caso del método de medición del PT, la concentración de calcio en el reactivo PT convencional puede ser de aproximadamente 10 a 12,5 mM.

30 El pH del reactivo para medir la coagulación sanguínea es preferiblemente de 6,0 a 8,0, más preferiblemente de 7,0 a 7,6. El pH del reactivo para medir la coagulación sanguínea puede regularse con un tampón usado en el reactivo convencional para medir la coagulación sanguínea. El tampón incluye, por ejemplo, HEPES, TRIS etc.

35 Además de los componentes descritos anteriormente, el reactivo para medir la coagulación sanguínea puede contener componentes en el reactivo convencionalmente conocido para medir la coagulación sanguínea en un intervalo tal que no se altere el efecto de la presente invención. Dichos componentes incluyen, por ejemplo, un activador, veneno de serpiente y un factor tisular. El activador incluye ácido elágico, caolín, celite, sílice coloidal, anhídrido silícico, alúmina y magnesio. El veneno de serpiente incluye veneno de víbora de Russell, veneno de víbora que contiene textarina y veneno de víbora que contiene ecarina. El factor tisular incluye tromboplastina tisular natural obtenida de cerebro de conejo, placenta humana o cerebro bovino, o tromboplastina tisular recombinada genéticamente.

45 El reactivo para medir la coagulación sanguínea puede usarse como un reactivo seleccionado entre el grupo compuesto por un reactivo para medir el tiempo de protrombina (PT), un reactivo para medir el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT), un reactivo para medir un anticoagulante lúpico (LA), un reactivo para medir un trombotest, un reactivo para un hepaplastintest, y un reactivo para cuantificar un factor de coagulación.

50 La presente invención proporciona el uso de un kit reactivo para medir el tiempo de coagulación sanguínea, que comprende un primer reactivo que contiene fosfolípido y un segundo reactivo que contiene calcio, en el que al menos uno del primero y el segundo reactivos comprende el quelante de calcio descrito anteriormente.

55 Más preferiblemente, el kit reactivo para medir la coagulación sanguínea comprende el reactivo para medir la coagulación sanguínea que se ha descrito anteriormente.

60 El reactivo para medir la coagulación sanguínea, cuando se usa, por ejemplo, en el método de medición del APTT, puede ser un kit reactivo que contiene un reactivo APTT, una solución de calcio y una solución que contiene el quelante, puede ser un kit reactivo que contiene un reactivo APTT que contiene tanto el quelante como fosfolípido, y una solución de calcio, o puede ser un kit reactivo que contiene un reactivo APTT y una solución que contiene el quelante y calcio.

65 El kit reactivo para medir la coagulación sanguínea, cuando se usa, por ejemplo, en el método de medición del PT, puede ser un kit reactivo que contiene un reactivo PT y el quelante.

5 El kit reactivo para medir la coagulación sanguínea puede contener otros reactivos usados como diversos reactivos habituales para medir la coagulación sanguínea. Los otros reactivos incluyen plasma convencional o suero convencional, plasma hecho deficiente en diversos factores de coagulación sanguínea, una solución tampón (por ejemplo, una solución tampón veronal para la dilución de una muestra de sangre o una solución de tampón imidazol), y similares.

La presente invención también proporciona un método para medir el tiempo de coagulación sanguínea, que comprende:

10 poner en contacto una muestra de sangre con calcio y fosfolípido en presencia de un reactivo de medición de la coagulación sanguínea que contiene un quelante de calcio que interfiere con la reacción entre el calcio y una sustancia diferente del factor de coagulación en la muestra de sangre pero que no interfiere con reacción de coagulación sanguínea, y

15 medir el tiempo de coagulación sanguínea.

La etapa de contacto se realiza preferiblemente en una muestra de medición obtenida mezclando el reactivo que contiene quelante para medir la coagulación sanguínea de acuerdo con la presente invención, una muestra de sangre, calcio y fosfolípido.

20 La muestra de sangre puede ser sangre completa o plasma al que se añade un anticoagulante. El plasma puede prepararse a partir de sangre completa por un método conocido en la técnica. El anticoagulante puede ser cualquier anticoagulante conocido en la técnica y es preferiblemente citrato sódico. La proporción de mezcla de sangre completa o plasma al anticoagulante puede seleccionarse adecuadamente dependiendo del tipo de tiempo de coagulación sanguínea a medir.

En la etapa de contacto, la concentración del quelante en la muestra de medición que contiene una muestra de sangre, el quelante, calcio y fosfolípido puede seleccionarse adecuadamente dependiendo del tipo de método de medición de la coagulación sanguínea, el tipo de quelante, y la concentración de calcio en la muestra de medición.

30 En el caso del método de medición del APTT, por ejemplo, la concentración del quelante en la muestra de medición es preferiblemente de 7 a 40 mM, más preferiblemente de 13 a 33 mM. En el caso del método de medición del PT, por ejemplo, la concentración del quelante en la muestra de medición es preferiblemente de 3,5 a 20 mM, más preferiblemente de 6,5 a 16,5 mM.

35 En la etapa de contacto, la concentración de calcio en la muestra de medición es habitualmente de aproximadamente 6,5 a 8,5 mM en el método de medición del APTT, por ejemplo, o es habitualmente de aproximadamente 6,5 a 8,5 mM en el método de medición del PT.

40 Se deduce que en la etapa de contacto, la concentración del quelante en la muestra de medición se establece preferiblemente de 0,8 a 6 veces, más preferiblemente de 1,5 a 5 veces, relativa a la concentración de calcio.

La concentración de fosfolípido en la muestra de medición es habitualmente de aproximadamente 10 a 60 mM en el método de medición del APTT, por ejemplo, o es habitualmente de aproximadamente 20 a 120 mM en el método de medición del PT.

45 La etapa de contacto puede realizarse mezclando una muestra de sangre, el reactivo que contiene quelante para medir la coagulación sanguínea, un reactivo que contiene calcio, y un reactivo que contiene fosfolípido.

50 En una realización, el reactivo para medir la coagulación sanguínea puede contener adicionalmente calcio.

En una realización, el reactivo para medir la coagulación sanguínea puede contener adicionalmente fosfolípido.

55 En una realización, el reactivo para medir la coagulación sanguínea puede contener adicionalmente calcio y fosfolípido.

La proporción de mezcla del reactivo para medir la coagulación sanguínea a una muestra de sangre puede seleccionarse adecuadamente dependiendo del tipo de tiempo de coagulación sanguínea a medir y de acuerdo con el método convencionalmente conocido para medir el tiempo de coagulación sanguínea.

60 En el método de medición del APTT, por ejemplo, puede mezclarse una muestra de sangre, el reactivo APTT y la solución de calcio en una proporción volumétrica de habitualmente 1:1:1 para generar la coagulación sanguínea.

En el método de medición del PT, puede mezclarse una muestra de sangre y el reactivo PT en una proporción volumétrica de habitualmente 1:2 para generar la coagulación sanguínea.

65

Preferiblemente, la etapa de contacto se realiza habitualmente a una temperatura de aproximadamente 37°C. El tiempo de contacto puede seleccionarse adecuadamente dependiendo del tipo de método de medición de la coagulación sanguínea.

5 La etapa de medición del tiempo de coagulación sanguínea se realiza preferiblemente midiendo información óptica obtenida de la coagulación sanguínea. La información óptica incluye un cambio en la luz transmitida, un cambio en la luz dispersada, etc. La información óptica puede detectarse usando un aparato de medición de la coagulación sanguínea convencionalmente conocido equipado con una parte de detección de información óptica. El aparato de medición de la coagulación sanguínea incluye, por ejemplo, CS-2000i y CS-2100i, ambos cuales están fabricados por Sysmex Corporation. Estos aparatos de medición de la coagulación sanguínea pueden medir un cambio en la luz transmitida, etc., para detectar el proceso de coagulación sanguínea en una muestra de medición preparada en la etapa de contacto.

Experimentos

15 A partir de ahora en este documento, la presente invención se describe en mayor detalle por referencia a los Ejemplos, pero la presente invención no está limitada a los siguientes ejemplos.

<Experimento de referencia 1>

20 En este experimento de referencia, se confirmó que en el método para medir un anticoagulante lúpico (LA), ocurre un cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición.

25 Cuando se usa una muestra que contiene una gran cantidad de un componente lipídico, tal como plasma quiloso, en la medición de la coagulación sanguínea, se hace reaccionar calcio con el componente lipídico en el plasma para causar la aglutinación, lo que puede provocar un cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición. En este ejemplo de referencia, por lo tanto, se usó plasma quiloso como muestra de sangre.

30 La medición se realizó usando un aparato de medición de la coagulación sanguínea CS-2000i (fabricado por Sysmex Corporation) (Elemento de medición: LA1). Específicamente, se incubaron 100 µl de plasma quiloso recogido de un paciente a 37°C durante 4 minutos. Se añadieron 100 µl de un reactivo de medición de LA (reactivo de exploración LA1 fabricado por Dade Behring) al plasma quiloso para preparar una muestra de medición, y se midió un cambio en la luz transmitida de la muestra de medición a 37°C durante 4 minutos.

35 Los resultados se muestran en la FIG. 2.

En la FIG. 2, el valor de luz transmitida se redujo rápidamente en una fase inicial de la reacción durante aproximadamente 40 segundos justo después de mezclar la muestra de sangre con el reactivo de medición. A partir de este resultado, se confirmó que en el método de medición del LA, se genera un cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición.

40

<Experimento de referencia 2>

45 En este experimento de referencia, se confirmó que en el método para medir el tiempo de protrombina (PT), ocurre un cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición.

50 La medición se realizó usando un aparato de medición de la coagulación sanguínea CS-2000i (fabricado por Sysmex Corporation) (Elemento de medición: PT). Específicamente, se incubaron 50 µl de plasma con bajo contenido en fibrinógeno recogido de un paciente a 37°C durante 3 minutos. Se añadieron 100 µl de un reactivo de medición de PT (Tromborel S fabricado por Dade Behring) al plasma con bajo contenido en fibrinógeno para preparar una muestra de medición, y se midió un cambio en la luz transmitida de la muestra de medición a 37°C durante 2 minutos.

Los resultados se muestran en la FIG. 3.

55 En este ejemplo de referencia, se usa plasma con bajo contenido en fibrinógeno como muestra de sangre. Por consiguiente, se considera que en esta medición, apenas ocurre un cambio óptico debido a la coagulación sanguínea. En la FIG. 3, sin embargo, el valor de luz transmitida se redujo en una fase inicial de la reacción durante aproximadamente 40 segundos justo después de mezclar la muestra de sangre con el reactivo de medición, revelando de este modo que se generó un cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición. La razón de que suceda dicho cambio óptico anormal en este ejemplo de referencia no es evidente, y se consideró este cambio óptico anormal atribuible a la reacción entre el calcio en el reactivo y una sustancia diferente del factor de coagulación sanguínea en el plasma. El reactivo de medición de PT contiene una cantidad relativamente grande de fosfolípido.

65 Por consiguiente, se considera que dicho cambio óptico anormal también se atribuible a la reacción entre el fosfolípido en el reactivo y el calcio.

<Experimento 1>

Los ejemplos de referencia mostraron que el cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición puede suceder no solamente debido a la reacción entre partículas lipídicas en una muestra de sangre y el calcio en el reactivo, sino también debido a la reacción entre el fosfolípido en el reactivo y el calcio. En este ejemplo, por lo tanto, se usó agua en lugar de una muestra de sangre para confirmar que en el método para medir el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT), sucede un cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición. Entonces, se examinó si el cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición, generado por la mezcla del reactivo APTT con calcio, puede suprimirse con un quelante de acuerdo con la presente invención.

La medición se realizó usando un aparato de medición de la coagulación sanguínea CS-2000i (fabricado por Sysmex Corporation) (Elemento de medición: APTT). Específicamente, se incubaron 5 µl de agua tratada en una membrana de ósmosis inversa (agua RO) en lugar de una muestra de sangre a 37°C durante 1 minuto. Se añadieron 75 µl de un reactivo de medición de APTT (Actina FSL fabricada por Dade Behring) al agua RO y se incubaron a 37°C durante 3 minutos. Se añadieron 75 µl de solución 25 mM de CaCl₂ que contenía un quelante a la mezcla para preparar una muestra de medición, y se midió un cambio en la luz transmitida de la muestra de medición a 37°C durante 3 minutos. El tipo y concentración del quelante en la solución de CaCl₂ son los se muestran en la siguiente Tabla 1. La medición se realizó con el quelante cuatro veces a cada concentración.

Tabla 1

Quelante	Constante de estabilidad quelante para Ca	Concentración (mM) de quelante en solución 25 mM de CaCl ₂				
		0	50	100	150	
Propionato sódico	0,68	0	50	100	150	
Maleato disódico	1,1	0	24	68	101	135
Malato disódico	2,24	0	15	30	45	60
Gluconato disódico	1,21	0	30	60	90	

Todos los quelantes anteriores se adquirieron de Sigma Aldrich.

En cada medición, se calculó un cambio en la luz transmitida por minuto durante 3 minutos después de añadir la solución de cloruro de calcio, usando la siguiente ecuación:

$$dH = ([\text{cantidad de luz transmitida después de un lapso de 3 minutos} - [\text{cantidad de luz transmitida cuando se añadió solución de CaCl}_2]])/3$$

El valor de dH refleja un cambio óptico en una fase inicial de la medición, y se estima que un valor más pequeño de dH es indicativo de un mayor efecto de supresión del cambio óptico en una fase inicial de la medición.

Los resultados se muestran en la FIG. 4. La FIG. 4 muestra el cambio promedio en 4 mediciones.

A partir de la FIG. 4, pudo confirmarse que como el valor de dH era 40 cuando la concentración del quelante era 0 mM, el cambio óptico en la fase inicial también puede suceder por la reacción entre fosfolípido en el reactivo y el calcio.

En la FIG. 4, se descubrió que el valor de dH se redujo por la incorporación de cada quelante en el reactivo. A partir de este resultado, se descubrió que un cambio óptico anormal en la primera fase de la medición puede suprimirse usando estos quelantes. En la FIG. 4, los quelantes, particularmente el ácido maleico y el ácido málico, mostraron un elevado efecto supresor. Por ejemplo, el ácido maleico mostró el efecto supresor a una concentración de 20 a 120 mM y mostró un mayor efecto supresor de 30 a 100 mM. El ácido málico mostró el efecto supresor a una concentración de 20 mM o más y mostró un mayor efecto supresor de 30 a 60 mM. El ácido glucónico mostró el efecto supresor a una concentración de 40 mM o más y mostró un mayor efecto supresor de 60 a 90 mM. El ácido propiónico mostró el efecto supresor a una concentración de 30 mM o más y mostró un mayor efecto supresor de 40 a 150 mM.

<Experimento 2>

Se usó plasma de control para un ensayo comercial de coagulación sanguínea para preparar una muestra de plasma pseudo-quiloso que después se usó en la medición del APTT.

Se añadió Intra Fat (fabricada por Takeda Pharmaceutical Company Limited) a una concentración del 0,2% al plasma de control P para el ensayo de coagulación sanguínea (fabricado por Dade Behring) para preparar una muestra de plasma pseudo-quiloso. El plasma de control P es plasma de control preparado de modo que su actividad de coagulación muestra un bajo valor por una anomalía en los factores de coagulación. Intra Fat es una preparación lipídica. Se estima que como la muestra de plasma pseudo-quiloso resultando tiene baja actividad de

coagulación, el cambio óptico en una fase inicial de la medición, causada por la reacción entre el calcio en el reactivo y el componente lipídico en la muestra, puede detectarse fácilmente.

La medición se realizó del mismo modo que en el Ejemplo 1, excepto en que se usó la muestra pseudo-quilosa en una cantidad de 50 µl en lugar del agua RO del Ejemplo 1, y el reactivo APTT y solución 25 mM de CaCl₂ a la que se había añadido el quelante se usaron en una cantidad de 50 µl respectivamente, y se calculó la cantidad de cambio (dH) de luz transmitida.

Como quelante, se usó malato disódico añadido a una concentración de 0 o 30 mM a la solución de CaCl₂. La medición se realizó con el quelante cuatro veces a cada concentración.

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2. La Tabla 2 muestra el cambio promedio en 4 mediciones.

Tabla 2

	Concentración de quelante en solución 25 mM de CaCl ₂	Cantidad de cambio (dH) de luz transmitida
Malato disódico	0 mM	80
	30 mM	33

En la Tabla 2, el valor de dH fue de 80 cuando la concentración de ácido málico como quelante fue de 0 mM, y por tanto pudo confirmarse el cambio óptico en una fase inicial de la medición, causado por la reacción entre el calcio en el reactivo y el componente lipídico en la muestra.

En la Tabla 2, se descubrió que el valor de dH se redujo por la incorporación del quelante en el reactivo. A partir de este resultado, se descubrió que el cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición, causado por la reacción entre el calcio en el reactivo y el componente lipídico en la muestra, puede suprimirse usando el quelante.

<Experimento 3>

En este ejemplo, se usó agua en lugar de una muestra de sangre para confirmar que en el método para medir el tiempo de tromboplastina (PT), ocurre un cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición. Entonces, se examinó si el cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición, generado por fosfolípido y calcio en el reactivo PT, puede suprimirse con un quelante de acuerdo con la presente invención.

La medición se realizó usando un aparato de medición de la coagulación sanguínea CS-2000i (fabricado por Sysmex Corporation) (Elemento de medición: PT). Específicamente, se incubaron 5 µl de agua tratada en una membrana de ósmosis inversa (agua RO) en lugar de una muestra de sangre a 37°C durante 3 minutos. Se añadieron 150 µl de un reactivo de medición de PT (Tromborel S fabricado por Dade Behring) que contenía maleato disódico como quelante al agua RO para preparar una muestra de medición, y se midió un cambio en la luz transmitida de la muestra de medición a 37°C durante 2 minutos. La concentración de maleato disódico en el reactivo de medición de PT es como se muestra en la siguiente Tabla 3. La medición se realizó con el quelante cuatro veces a cada concentración.

Se calculó la cantidad de cambio (dH) en la luz transmitida en cada medición. Los resultados se muestran en la Tabla 3. La Tabla 3 muestra el cambio promedio en 4 mediciones.

Tabla 3

	Concentración de quelante en solución 25 mM de CaCl ₂	Cantidad de cambio (dH) de luz transmitida
Malato disódico	0 mM	29
	34 mM	13
	68 mM	8
	101 mM	9
	135 mM	6

A partir de la Tabla 3, pudo confirmarse que como el valor de dH era 29 cuando la concentración de ácido maleico como quelante era 0 mM, también podía ocurrir un cambio óptico en una fase inicial mediante la reacción entre fosfolípido y calcio en el reactivo.

En la Tabla 3, se descubrió que el valor de dH se redujo por la incorporación del quelante en el reactivo. A partir de este resultado, se descubrió que puede suprimirse un cambio óptico anormal en una fase inicial de la medición usando el quelante. En la Tabla 3, el ácido maleico mostró el efecto supresor a una concentración de 34 mM o más y mostró un mayor efecto supresor de 68 a 135 mM.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir el tiempo de coagulación de una muestra de sangre, que comprende poner en contacto la muestra de sangre, calcio, y un compuesto seleccionado entre el grupo compuesto por fosfolípido, factor tisular, y un complejo de factor tisular y fosfolípido, en presencia de un quelante de calcio, en el que el quelante de calcio tiene una constante de estabilidad quelante para el calcio inferior que la del ácido cítrico o su sal generalmente usada como anticoagulante y en el que el quelante de calcio se elige entre el grupo compuesto por ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido citracónico, ácido itacónico, ácido tricarbálico, ácido propano-1,1,2,3-tetracarboxílico, ácido butano-1,2,3,4-tetracarboxílico, ácido glicólico, ácido tioglicólico, ácido tartárico, ácido isocítrico, ácido pirúvico, ácido oxaloacético, y sales de los mismos, y medir el tiempo de coagulación de la muestra de sangre.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre se pone en contacto con al menos un activador seleccionado entre el grupo compuesto por ácido elálgico, caolín, celite, sílice coloidal, anhídrido silícico, alúmina y magnesio en la etapa de contacto.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el quelante de calcio es al menos uno seleccionado entre el grupo compuesto por ácido maleico, ácido málico, y sales de los mismos.
4. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de quelante de calcio en una mezcla de calcio, fosfolípido y muestra de sangre es de 0,8 a 6 veces la concentración del calcio.
5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tiempo de coagulación se mide detectando una información óptica de una mezcla de calcio, fosfolípido y muestra de sangre.
6. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tiempo de coagulación se mide detectando un cambio de una información óptica de una mezcla de calcio, fosfolípido y muestra de sangre.
7. El método de acuerdo con las reivindicaciones 5 ó 6, en el que la información óptica se selecciona entre el grupo compuesto por luz transmitida y luz dispersada.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el método es para la medición del tiempo de protrombina, la medición del tiempo de tromboplastina parcial activado, la medición de anticoagulante lúpico, trombotest, hepaplastintest, o la cuantificación de factor de coagulación.
9. Uso de un reactivo que comprende un quelante de calcio en un método para la medición del tiempo de coagulación de una muestra de sangre, en el que dicho método comprende poner en contacto la muestra de sangre, calcio, y un compuesto seleccionado entre el grupo compuesto por fosfolípido, factor tisular, y un complejo de factor tisular y fosfolípido, en presencia de dicho quelante de calcio, y medir el tiempo de coagulación de la muestra de sangre, y en el que dicho quelante de calcio se elige entre el grupo compuesto por ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido citracónico, ácido itacónico, ácido tricarbálico, ácido propano-1,1,2,3-tetracarboxílico, ácido butano-1,2,3,4-tetracarboxílico, ácido glicólico, ácido tioglicólico, ácido tartárico, ácido isocítrico, ácido pirúvico, ácido oxaloacético, y sales de los mismos.
10. Uso de un kit reactivo que comprende un primero y un segundo reactivos, en el que el primer reactivo comprende al menos uno seleccionado entre el grupo compuesto por fosfolípido, factor tisular, y un complejo de factor tisular y fosfolípido, y el segundo reactivo comprende calcio, en el que un quelante de calcio está comprendido en el primer reactivo, el segundo reactivo o ambos, en un método para la medición del tiempo de coagulación de una muestra de sangre, en el que dicho método comprende poner en contacto dicha muestra de sangre, dicho primer reactivo, dicho segundo reactivo y dicho quelante de calcio, y medir el tiempo de coagulación de la muestra de sangre, y en el que dicho quelante de calcio se elige entre el grupo compuesto por ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido citracónico, ácido itacónico, ácido tricarbálico, ácido propano-1,1,2,3-tetracarboxílico, ácido butano-1,2,3,4-tetracarboxílico, ácido glicólico, ácido tioglicólico, ácido tartárico, ácido isocítrico, ácido pirúvico, ácido oxaloacético, y sales de los mismos.
11. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 ó 10, en el que el quelante de calcio es al menos uno seleccionado entre el grupo compuesto por ácido maleico, ácido málico, y sales de los mismos.
12. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 11, en el que la concentración de quelante de calcio en una mezcla de calcio, fosfolípido y muestra de sangre es de 0,8 a 6 veces la concentración del calcio.
13. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 12, en el que el tiempo de coagulación se mide detectando una

información óptica de una mezcla de calcio, fosfolípido y muestra de sangre.

- 5 14. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 12, en el que el tiempo de coagulación se mide detectando un cambio de una información óptica de una mezcla de calcio, fosfolípido y muestra de sangre.
15. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 13 ó 14, en el que la información óptica se selecciona entre el grupo compuesto por luz transmitida y luz dispersada.
- 10 16. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 15, en el que el método se para la medición del tiempo de protrombina, la medición del tiempo de tromboplastina parcial activado, la medición de anticoagulante lúpico, trombotest, hepaplastintest, o la cuantificación de factor de coagulación.

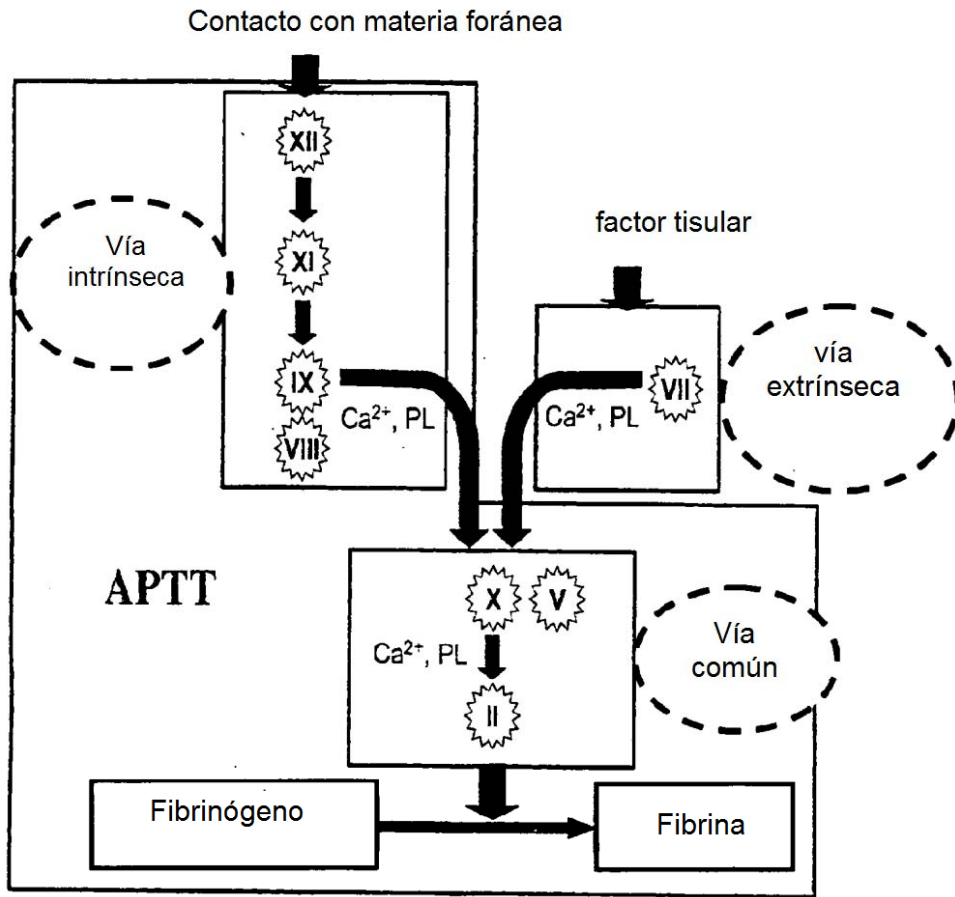


Fig. 1

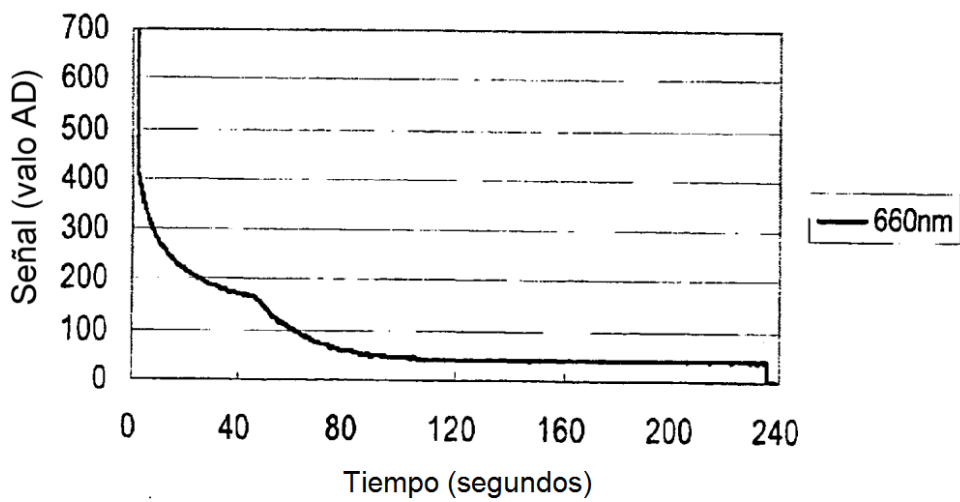


Fig. 2

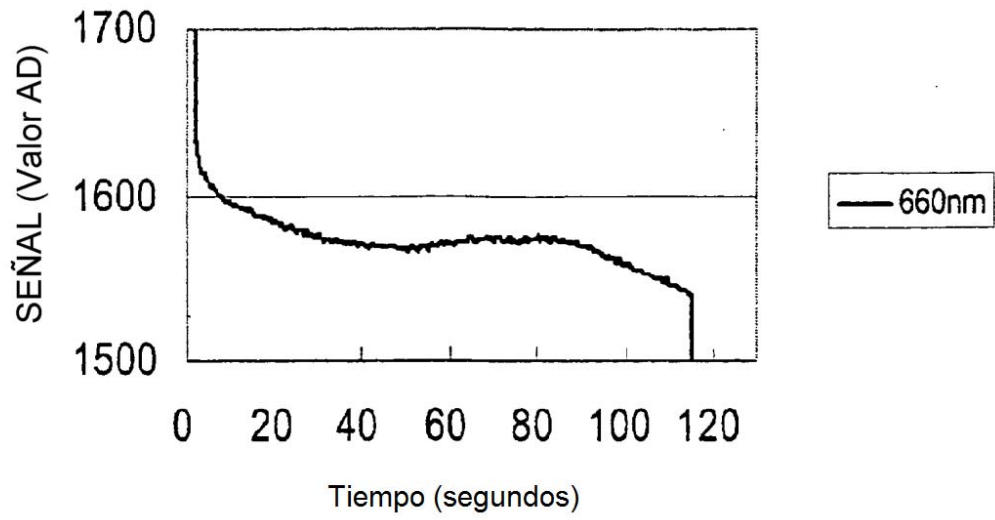


Fig. 3

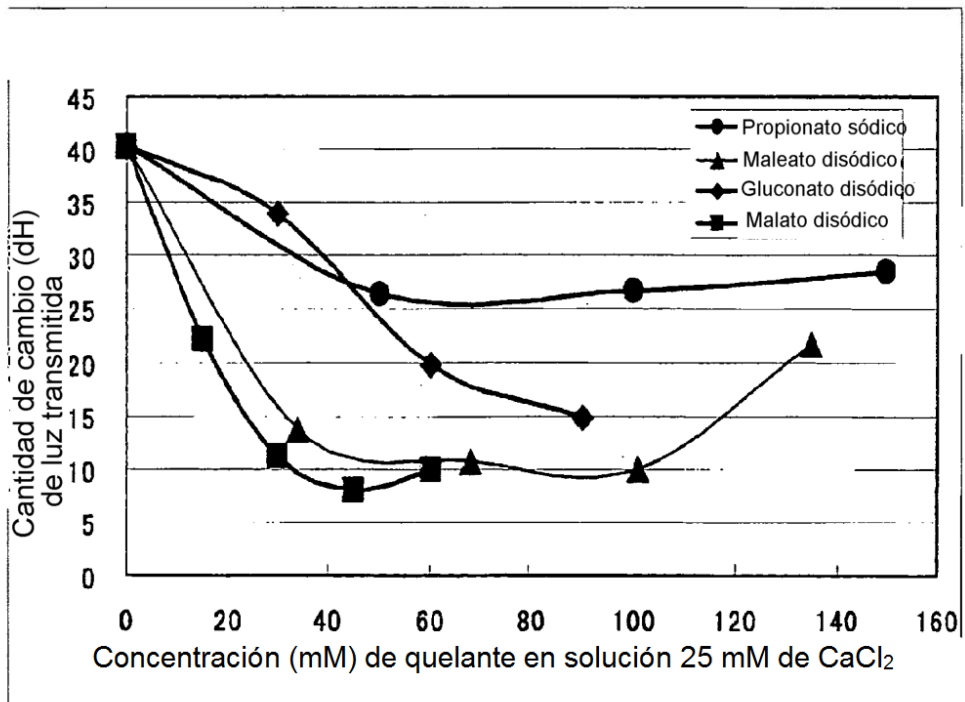


Fig. 4