

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 727**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00912349 .8**

96 Fecha de presentación: **28.01.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1149173**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2001**

54

Título: **Procedimiento para determinar la concentración de inhidores de la trombina**

30

Prioridad:

04.02.1999 DE 19904674

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73

Titular/es:

**JENAFFIN GMBH (100.0%)
WINZERLAER STRASSE 2
07745 JENA, DE**

72

Inventor/es:

**NOWAK, GÖTZ y
BUCHA, ELKE**

74

Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 393 727 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 determinar la concentración de inhibidores de la trombina

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la concentración de inhibidores de la trombina, en donde al líquido corporal de un ser vivo se le añade una sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o meizotrombina del fragmento 1 (en adelante, Mtdelfg1). Se entiende por inhibidores de la trombina todos los materiales naturales o sintéticos que inhiben directamente la trombina o los precursores de la trombina. Como ejemplo de un inhibidor de la trombina natural cabe citar la hirudina, que se puede obtener de la saliva de las sanguijuelas *Hirudo medicinalis*. La hirudina es una proteína muy pequeña que consta de 65 aminoácidos y presenta un peso molecular de 7 kD. Ejemplos de inhibidores sintéticos de la trombina son los llamados hirulogos, que presentan secuencias parciales análogas u homólogas a la hirudina, así como polipéptidos constituidos por o con un tripéptido Phe-Pro-Arg o derivados de dicho tripéptido, como por ejemplo derivados del ácido bórico, derivados del clorometilcetona, derivados de la benzamidina, arginina, derivados modificados por aminoácidos o similar. Estas sustancias tienen muy probablemente esencialmente el mismo mecanismo de acción que la hirudina. Los seres vivos donantes del líquido pueden ser humanos y mamíferos, como son los roedores. Ejemplos de líquidos corporales son en particular la sangre o el plasma sanguíneo obtenido de la sangre. Pero también pueden intervenir líquidos corporales que no contienen protrombina, como la orina, el fluido, la saliva o el líquido peritoneal entre otros. En el marco de la invención se añade después protrombina. No turbio significa que no hay una cantidad significativa de sustancias en suspensión en el líquido que se está examinando. Esto puede conseguirse en caso necesario, por ejemplo, mediante centrifugación del líquido corporal y retirada del material sobrante.

Los antecedentes teóricos que subyacen a la invención son los siguientes. La conversión de protrombina en trombina es un factor esencial en la coagulación sanguínea. La trombina actúa en la formación de monómeros de fibrina a partir del fibrinógeno, así como en la polimerización de los monómeros de fibrina. La protrombina se transforma en trombina bajo la acción del factor X activado, el factor V activado, iones Ca^{++} y fosfolípidos, como el factor de plaquetas 3. En este caso tiene lugar una reacción de varios niveles, en donde se forman sustancias intermedias en una cantidad reducida similar. Si, sin embargo, la coagulación se induce mediante por ejemplo ecarina u otro veneno de serpiente o fracción de veneno de serpiente, surge una sustancia intermedia "atípica", como es la meizotrombina, la meizotrombina PIVKA o la meizotrombina del fragmento 1 (PIVKA es la abreviatura de una proteína que se induce mediante un antagonista de la vitamina K). Resulta interesante que estas sustancias intermedias se inactivan por ejemplo mediante la hirudina, pero no mediante la heparina (inhibidor de los factores IIa, IXa, XIa, XIIa y/o la antitrombina). Además, conducen también a la formación de trombina y, subsiguientemente, a la coagulación. Esta propiedad de las sustancias intermedias "atípicas" de activar los factores de la cascada de coagulación sanguínea se describe en Doyle et al, The Journal of Biological Chemistry, vol. 265, Nº 18 pp 10693 - 10701, Jun. 1990, EP 0 570 355 A1 y US 5,529.905. La afinidad existente entre la hirudina y otros inhibidores sintéticos de la trombina y las sustancias intermedias es muy alta ($k_1 > 10^{-10}$ mol/l para la meizotrombina), de modo que el inhibidor de la trombina fija temporalmente una sustancia intermedia atípica libre. La inhibición de fragmentos de protrombina por parte de los inhibidores de la trombina se describe en Jin-Hua, Han et al., The Journal of Biological Chemistry, vol. 272, No. 45 pp 28660 - 28665, Nov. 1997.

Estas circunstancias se utilizan en un procedimiento del tipo citado al principio, que se describe en la obra bibliográfica US-A-5,547,850, en donde el uso del inhibidor de la trombina se registra en cierto modo mediante la medición del retraso de la coagulación. Una gran cantidad de inhibidor de la trombina hace que pase mucho tiempo hasta que se produzca la coagulación y viceversa. Este procedimiento ha demostrado su eficacia excelente en la práctica. No obstante, se ha observado la desventaja de que en los casos de un nivel de fibrinógeno reducido pueden aparecer falseamientos, pues un nivel de fibrinógeno (demasiado) reducido, así como un nivel alto de inhibidor de la trombina, puede conducir a tiempos de coagulación demasiado largos.

La invención intenta enfrentarse al problema técnico de encontrar un procedimiento para la determinación de la concentración de los inhibidores de la trombina que ofrezca valores exactos independientemente del nivel de fibrinógeno.

Para solucionar este problema la invención presenta un procedimiento para la determinación de la concentración de los inhibidores de la trombina en un líquido no turbio o en un extracto no turbio de un líquido corporal con los siguientes pasos del procedimiento: a) el líquido corporal de un ser vivo se somete en caso necesario a la separación de los precipitados turbios; b) al líquido no turbio obtenido en el paso a) se le añade un anticoagulante que no interviene en la transformación protrombina/meizotrombina activa o Mtdelfgl, un substrato cromógeno o fluorógeno escindible mediante meizotrombina activa o Mtdelfgl y una sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1, así como, opcionalmente protrombina; c) la disolución o mezcla obtenida en el paso b) se somete a una medición de absorción o emisión de luz con longitud de onda selectiva en función del tiempo; d) a partir de la reducción de la absorción o la emisión de luz del paso c) por unidad de tiempo, se determina la cantidad de inhibidor de la trombina contenido en el líquido corporal comparando con las curvas estándar calculadas. De manera alternativa a la sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1 o de manera adicional, puede añadirse meizotrombina o Mtdelfg1. - Se denomina substrato cromógeno a las sustancias que contienen

5 grupos cromóforos y son escindidas específicamente por la trombina de forma cromófora. Los sustratos fluorógenos son sustancias que pueden ser escindidas específicamente por la trombina formando sustancias fluorescentes. Puede añadirse protrombina cuando el líquido corporal no contiene por naturaleza suficiente protrombina, como en el caso de la carencia de vitamina K, o cuando la cantidad esperada de inhibidor de la trombina o la actividad del inhibidor de la trombina lo aconseja, o cuando durante una enfermedad ha surgido una carencia de protrombina.

10 La invención se basa en el sorprendente reconocimiento de que las sustancias cromógenas o fluorógenas, que son escindidas de forma específica por la trombina, también pueden escindirse específicamente por la meizotrombina o Mtdelfg1. No cabe esperar que esto ocurra, pues las sustancias intermedias representan pasos previos necesarios, pero por naturaleza no despliegan los mismos efectos o reactividades que la trombina. El hecho de que la reacción de detección según la invención tenga lugar únicamente a través de la vigilancia de la meizotrombina o la inhibición del Mtdelfg1 mediante una reacción cromática, hace que la detección sea totalmente independiente del nivel de fibrinógeno. Más bien durante el uso de líquidos corporales, en particular sangre y plasma sanguíneo, la coagulación debe incluso impedirse para no interferir en la evaluación de la reacción cromática. Además, la determinación de los inhibidores de la trombina según la invención es en todas las áreas tan precisa como la determinación mediante el método previamente conocido con alto nivel de fibrinógeno. También existe independencia de posibles anticoagulantes contenidos en el líquido corporal que se hayan administrado de forma oral. Otras ventajas son: medición rápida en el transcurso de minutos en los canales cromógenos de los analizadores automáticos estándar de la coagulación (estos miden la turbidez con frecuencia a varias longitudes de onda a efectos de corrección y por lo general presentan la posibilidad de una medición de la absorción de luz con longitud de onda selectiva y longitud de onda variable); alta reproducibilidad de los valores encontrados en virtud de una dispersión muy reducida de los valores individuales (el intervalo de confianza se encuentra según una gran cantidad de series de ensayos por debajo del 5%, por lo general entre el 2,2 y el 3,5%); la alta precisión o reproducibilidad se alcanza además incluso con niveles muy altos de inhibidores de la trombina o de hirudina; en virtud de las propiedades existentes el procedimiento según la invención resulta adecuado para la estandarización nacional e internacional.

25 El procedimiento según la invención puede tener uso por un lado en la ciencia, a saber en todas las áreas de ensayos en las que deban determinarse concentraciones de inhibidores de la trombina, así como en el cribado (en su caso, de alta capacidad) de inhibidores prospectivos de la trombina. En este último caso puede estudiarse con alto rendimiento una gran cantidad de inhibidores prospectivos sintéticos para saber cuál es su efecto real. Actividad implica en este caso la determinación de si realmente tiene lugar una inhibición y, en caso afirmativo, la determinación de cómo es la cinética o la actividad específica. Por otro lado, también tiene un uso clínico, por ejemplo, en la supervisión de los niveles de inhibidores de la trombina en pacientes a los que se les administra el inhibidor por razones terapéuticas. De forma sencilla y asequible puede evitarse así que se dé una dosis demasiado alta o demasiado baja del inhibidor de la trombina, en una supervisión tanto casi continua como discontinua.

35 En particular, puede seleccionarse el anticoagulante que no interviene en la conversión protrombina/meizotrombina activa o Mtdelfg1 a partir del grupo "formadores de complejos de calcio, heparina, heparinoides, antitrombina III, proteína C, inhibidores de la polimerización de la fibrina y mezclas de estas sustancias". Un ejemplo concreto a este respecto es Pefabloc FG de la empresa Pentapharm AG, Basilea, Suiza, que es un tetrapéptido (Glu-Pro-Arg-Pro) y evita con alta afinidad la polimerización del fibrinógeno. La sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1 puede seleccionarse del grupo de los venenos de serpiente y las fracciones de venenos de serpiente; por ejemplo, venenos de *Dispholidus*, *Rhabdophis*, *Bothrops*, *Notechis*, *Oxyuranus* y víboras de Russel. Para propósitos prácticos se utilizan fracciones purificadas de los mismos. Preferiblemente se utiliza ecarina, una fracción altamente purificada de la toxina *Equis-carinatus* o Multisquamase, la enzima que escinde la protrombina de *Echis multisquamatus*. Tales sustancias, como por ejemplo la ecarina, pueden adquirirse comercialmente, por ejemplo, en la empresa Pentapharm AG, Suiza.

45 El sustrato cromógeno escindible mediante meizotrombina activa o Mtdelfg1 puede liberar p-nitroanilina en la escisión y la medición de la absorción de luz puede realizarse entonces a 405 nm. Ejemplos de tales sustratos y también de otros son tripéptidos que pueden adquirirse con los nombres Chromozym TH o Pefachrom TH en las empresas Chromogenix, Boehringer, Pentapharm (Pefachrom TH es H-D-ChG-Ala-Arg-pN.2AcOH). Un ejemplo de sustratos fluorocromos es Pefachrom TH fluorógeno, que puede adquirirse con el nombre Pefa 15865 en la empresa Pentapharm.

55 En particular en las actividades en cuestión en el paso c) se recomienda realizar una primera medición de absorción o emisión después de 0 a 100 s, preferiblemente de 0 a 50 s y más preferiblemente de 5 a 15 s, y una segunda después de 10 a 1000 s, preferiblemente de 50 a 500 s y más preferiblemente de 150 a 300 s, contados a partir de la adición de la sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1 o de la meizotrombina o MTdelfg1. El procedimiento según la invención está concebido en particular para la determinación de hirudina o la determinación de la concentración y/o de la actividad de inhibidores sintéticos de la trombina o hirulogos.

La invención se refiere también a un kit de prueba para la determinación de la concentración de los inhibidores de la trombina en un líquido no turbio o en un extracto no turbio de un líquido corporal con los siguientes componentes del kit: K1) una solución de un anticoagulante que no interviene en la conversión protrombina/meizotrombina activa o

5 Mtdelfg1; K2) un sustrato cromógeno o fluorógeno escindible mediante meizotrombina activa o Mtdelfg1 y K3) una solución de una sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1, en donde el componente K3) puede sustituirse o complementarse con un complemento K3a), una solución con meizotrombina o Mtdelfg1. Los componentes del kit pueden separarse entre sí, pero se prevén en un único envase del kit de prueba. Como componente adicional opcional del kit puede preverse una solución con protrombina.

En todo caso se entiende que con la adición de trombina, meizotrombina o Mtdelfg1 y/o sustancias que escinden meizotrombina o Mtdelfg1, éstas se utilizan en las cantidades predefinidas. Lo mismo cabe decir del sustrato.

Para el kit de prueba según la invención se aplican las explicaciones detalladas correspondientes al procedimiento según la invención.

10 Si se utiliza meizotrombina o Mtdelfg1, ésta puede adquirirse comercialmente, por ejemplo, en la empresa Pentapharm AG, Suiza, pero también puede fabricarse, por ejemplo, según las directrices de la obra bibliográfica US-A-5,547,850 con ecarina inmovilizada.

15 Los aparatos que se utilizan en el marco de la invención son en su mayoría analizadores de coagulación semiautomáticos o totalmente automáticos disponibles. Pueden utilizarse, por ejemplo, analizadores automáticos de la coagulación del tipo Sysmex CA-500 o S2000 de la empresa Dade-Behring o del tipo Electra 2000. En el CA-500 la luz emitida por un LED es enviada a través de un filtro (405 nm) y, a continuación, a través de la muestra. El CA-500 determina en el canal cromógeno la modificación o la reducción de la absorción de luz de los colorantes, como es la pNA (p-nitroanilina). Si en una prueba hay, por ejemplo, hirudina, la meizotrombina o Mtdelfg1 generada o añadida se inactiva, lo que tiene como consecuencia que se impide la liberación de pNA. La densidad óptica de la muestra que se comporta diferente (cambia) en este sentido se registra mediante un fotodiodo y se evalúa. La modificación de la absorción de luz que se observa es inversamente proporcional a la actividad de la hirudina.

A continuación se explicará la invención a partir de experimentos que representan ejemplos de realización.

Para la determinación de una curva estándar se mezcló plasma citratado humano agrupado con la cantidad predeterminada de solución de hirudina. Las soluciones estándar así obtenidas se midieron en un CA-500.

25 Como reactivos se añadieron:

Reactivo 1 [inhib] (temperatura ambiente): 400 µl Pefabloc FG (20 mM; disuelto en 0,9% NaCl) + 2100 µl tampón tris,

Reactivo 2 [cromo] (temperatura ambiente): Pefachrome TH (10 µmol/vial), diluido en 3 µmol/ml de agua destilada,

30 Reactivo 3 [ecarina] (15 °C): Ecarina (50 EU/vial), diluida en 0,3 EU/ml; el contenido del vial de ecarina se disuelve en 5 ml de solución de NaCl al 0,9% y, poco antes del uso, se ajusta a la concentración final con una mezcla 1:2 de NaCl al 0,9%, con un contenido del 1% de Prionex (Merck) y 0,1 M de solución de CaCl₂.

El protocolo de prueba se reproduce a continuación. Como tampón diluido se utilizó una mezcla de 16,6 µl de protrombina (purificada; contenido en proteínas: 2,22 mg/ml) y 984 µl de una mezcla de 900 µl de tampón tris (0,05 M, pH 8, 37 °C, + 0,1 M NaCl) y 100 µl Prionex (Merck).

Protocolo de prueba

35

Nombre	Ecch
Detector	Cromo
Punto de inicio	5 seg
Punto final	180 seg
Sensibilidad	Baja ganancia
1 volumen muestra	Plasma citratado 5 µl Tampón 70 µl
Volumen diluido	
2 volumen muestra	0 µl
*****	0 µl
Reactivo 1	30 seg
Vol. react.	Inhib 125 µl
Aclarar	125 µl
Reactivo 2	120 seg
Cromo	Cromo 20 µl
Aclarar	100 µl
Reactivo 3	210 seg

ES 2 393 727 T3

Vol. react.	Ecarina 20 μ l
Aclarar	50 μ l

(Aclarar: solución de hipoclorito de sodio al 1%)

5 En la fig. 1 se reproduce la curva estándar obtenida. Llama la atención el coeficiente de correlación extremadamente bueno de 0,9977. En el experimento sólo la muestra estándar se sustituye por una muestra que debe determinarse y la concentración desconocida de hirudina de la figura 1 se lee a partir de la reducción medida de la densidad óptica.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación de la concentración de los inhibidores de la trombina en un líquido no turbio o en un extracto no turbio de un líquido corporal con los siguientes pasos del procedimiento:
 - 5 a) el líquido corporal de un ser vivo se somete en caso necesario a una separación de los precipitados turbios,
 - b) al líquido no turbio obtenido en el paso a) se le añade un anticoagulante que no interviene en la transformación protrombina/meizotrombina activa o Mtdelfgl, un sustrato cromógeno o fluorógeno escindible mediante meizotrombina activa o Mtdelfgl y una sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1, así como, opcionalmente protrombina,
 - 10 c) la disolución o mezcla obtenida en el paso b) se somete a una medición de absorción o emisión de luz con longitud de onda selectiva en función del tiempo,
 - d) a partir de la reducción de la absorción o la emisión de luz del paso c) por unidad de tiempo, se determina la cantidad de inhibidor de la trombina contenido en el líquido corporal comparando con las curvas estándar determinadas.
- 15 2. Procedimiento para la determinación de la actividad de los inhibidores de la trombina en un líquido no turbio o en un extracto no turbio de un líquido corporal con los siguientes pasos del procedimiento:
 - a) el líquido corporal de un ser vivo se somete en caso necesario a una separación de los precipitados turbios,
 - 20 b) al líquido no turbio obtenido en el paso a) se le añade una cantidad predeterminada de inhibidor de la protrombina, en su caso un anticoagulante que no interviene en la transformación protrombina/meizotrombina activa o Mtdelfgl, un sustrato cromógeno o fluorógeno escindible mediante meizotrombina activa o Mtdelfgl y una sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1, así como, opcionalmente protrombina,
 - 25 c) la disolución o mezcla obtenida en el paso b) se somete a una medición de absorción o emisión de luz con longitud de onda selectiva en función del tiempo,
 - d) a partir de la reducción de la absorción o la emisión de luz del paso c) por unidad de tiempo, se determina la actividad del inhibidor de la trombina comparando con las curvas estándar determinadas.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en donde el anticoagulante que no interviene en la conversión protrombina/meizotrombina activa o Mtdelfg1 se selecciona a partir del grupo "formadores de complejos de calcio, heparina, heparinoides, antitrombina III, proteína C, inhibidores de la polimerización de la fibrina y mezclas de estas sustancias".
- 30 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1 se selecciona a partir del grupo de venenos de serpiente y fracciones de venenos de serpiente.
- 35 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1 es la ecarina.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el sustrato cromógeno escindible mediante meizotrombina activa o Mtdelfg1 libera p-nitroanilina en la escisión y la medición de la absorción de luz se realiza a 405 nm.
- 40 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde en el paso c) se realiza una primera medición de absorción o emisión después de 0 a 100 s, preferiblemente de 0 a 50 s y más preferiblemente 5 a 15 s, y una segunda después de 10 a 1000 s, preferiblemente de 50 a 500 s y más preferiblemente de 150 a 300 s, contados a partir de la adición de la sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1 o de la meizotrombina o MTdelfg1.
- 45 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el inhibidor de la trombina es la hirudina, un hirulogo o un inhibidor sintético de la trombina.

9. Kit de prueba para la determinación de la concentración de los inhibidores de la trombina en un líquido no turbio o en un extracto no turbio de un líquido corporal con los siguientes componentes del kit: K1) una solución de un anticoagulante que no interviene en la conversión protrombina/meizotrombina activa o Mtdelfg1; K2) un sustrato cromógeno o fluorógeno escindible mediante meizotrombina activa o Mtdelfg1 y K3) una solución de una sustancia que escinde la protrombina en meizotrombina o Mtdelfg1, en donde el componente K3) puede sustituirse o complementarse con un complemento K3a) una solución con meizotrombina o Mtdelfg1.
- 5
10. Kit de prueba según la reivindicación 9, en donde los componentes del kit pueden separarse entre sí, pero se prevén en un único envase del kit de prueba.
- 10 11. Kit de prueba según una de las reivindicaciones 9 o 10, en donde como componente adicional opcional del kit se prevé una solución con protrombina.

Figura 1

