

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 146**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2007 E 07785810 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2029768**

54 Título: **Método para determinar la actividad de la trombina en plasma**

30 Prioridad:

06.06.2006 EP 06011678

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.06.2013

73 Titular/es:

**THROMBINOSCOPE B.V. (100.0%)
OUDE MAASSTRAAT 47
6229 BC MAASTRICHT, NL**

72 Inventor/es:

**GIESEN, PETER L.A. y
VAN ASTEN, C.P. TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 407 146 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 determinar la actividad de la trombina en plasma.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se enmarca en el sector diagnóstico y, en particular, se refiere a un nuevo método para determinar formas biológicamente activas de enzimas proteolíticas, tales como la trombina, en sangre y en otros fluidos, así como a un kit de ensayo para la realización del método.

Antecedentes

- 10 Muchos laboratorios en el sector bioquímico, químico, médico, diagnóstico y similares están interesados en medir la generación de enzimas en un medio biológico. En general, para ello se utilizan sustratos señalizadores que liberan un cromóforo o fluoróforo que, después de la conversión, proporcionan una señal cromogénica o fluorogénica que se puede seguir en el tiempo y medir.

Un método apropiado para seguir la formación de enzimas con el tiempo en un medio biológico es añadir el sustrato directamente al medio biológico, por ejemplo la adición de un sustrato fluorogénico a un plasma en coagulación donde se forma trombina. Esto tiene la ventaja de que la generación de enzimas se mide en su medio fisiológico.

- 15 Las desventajas de este método se derivan de que la actividad de la enzima hacia cualquier sustrato fisiológico, que también puede estar presente en el medio, compite con el sustrato señalizador añadido y de que el sustrato puede consumirse por completo antes de finalizarse la generación de enzimas. Con el fin de minimizar estos efectos, habitualmente se seleccionan aquellos sustratos que no se enlazan estrechamente con la enzima (es decir con K_M baja) y que no se convierten demasiado rápidamente (es decir con k_{cat} baja).
- 20 Otro problema es que normalmente la señal medida depende de la turbidez y del color del medio donde se produce la reacción. Por ello, la misma cantidad de enzimas en un medio de diferente origen o de diferentes donantes puede proporcionar una cantidad de señal diferente. Por otro lado, la concentración del cromóforo o fluoróforo puede no ser directamente proporcional a la cantidad de señal. Esto hace más difícil calcular la cantidad de enzima presente durante el tiempo de reacción. Para cuantificar de modo preciso la concentración de enzimas con el tiempo deben
- 25 tenerse en cuenta todos estos efectos.

- La WO 03/093831 describe un método para determinar en tiempo real el desarrollo de la actividad proteolítica, en particular la actividad de trombina, en una muestra de sangre o plasma a medida que aparece y desaparece de la muestra, comprendiendo el método la adición de un sustrato de trombina a la muestra que, por unidad de tiempo, produce una señal detectable en una magnitud que tiene relación con la cantidad de trombina presente.
- 30 Simultáneamente en una muestra de control de la misma sangre o plasma, donde no se activa la generación de trombina, se mide la actividad de un preparado estándar con una actividad de trombina invariable. Se obtiene la cantidad molar exacta de trombina en cualquier momento por comparación de la actividad medida en sangre en coagulación con una curva de calibración obtenida a partir de una calibración medida simultáneamente. También se describe que si el color del medio no influye en la señal, esta curva de calibración puede determinarse más
- 35 exactamente para cada color del medio utilizado.

El método para medir la misma cantidad de enzimas calibradas en otro medio de otro color o turbidez resulta en una curva de calibración muy similar excepto en lo que se refiere a los llamados efectos "dependientes del medio".

- La presente invención proporciona un método alternativo donde esta curva de calibración se mide sólo una vez en un medio y las medidas en medios similares de diferente color o turbidez no se realizan ya midiendo la curva completa, sino que se pueden sustituir por una medida de "un solo punto".
- 40

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para determinar la evolución de la trombina con el tiempo en una muestra de plasma que comprende los siguientes pasos:

- 45 a) añadir un sustrato señalizador a una mezcla de reacción que contiene una cantidad predeterminada de actividad de trombina, donde dicho sustrato señalizador genera una señal detectable relacionada con el producto de conversión formado después de la reacción con dicha actividad de trombina y medir la señal detectable;
- 50 b) proporcionar una curva que muestra la evolución con el tiempo del desarrollo de la señal en dicha mezcla de reacción y determinar la pendiente inicial de la curva, su nivel final y su curvatura;
- c) añadir un sustrato señalizador a dicha muestra de plasma donde se produce la generación de trombina, generando dicho sustrato señalizador una señal detectable relacionada con el producto de conversión

formado después de la reacción con la trombina, y medir dicha señal detectable para obtener una curva que muestra la intensidad de fluorescencia en función del tiempo;

- 5
- d1) añadir un compuesto fluorescente a la misma muestra mencionada en el paso c), o a otra muestra del mismo plasma donde se produce la generación de trombina, para obtener una señal detectable a utilizar como medida para la influencia de la turbidez y/o del color del plasma sobre la señal; o
- 10
- d2) medir la densidad óptica de la misma muestra mencionada en el paso c), o de otra muestra del mismo plasma donde se ha producido la generación de trombina, para obtener una medida en cuanto a la influencia de la turbidez y/o del color del plasma sobre la señal, o
- 15
- d3) proporcionar una fuente fluorescente y colocar dicha fuente fluorescente de manera que la luz de excitación atraviese la muestra de sangre o plasma hasta la fuente y/o de manera que la luz emitida atraviese dicha muestra para alcanzar el detector, y medir la señal detectada, para obtener una medida en cuanto a la influencia de la turbidez y/o del color provocada por el plasma en la señal;
- e) comparar la medida de las señales detectadas en cualquiera de los pasos d1), d2) y d3) con la medida de las señales detectadas en el paso a) para obtener un factor de corrección para la turbidez y el color del plasma en el que se produce la generación de trombina, y
- 20
- f) utilizar la curvatura del paso b) para corregir no-linealidades en la curva del paso c) usando el factor de corrección del paso e) para corregir la curva del paso c) en cuanto a la turbidez y el color del plasma y utilizar la pendiente inicial del paso b) para calcular la concentración de trombina en función del tiempo a partir de la curva del paso c) con el fin de determinar el desarrollo de la actividad de trombina.
- 25
- Además, la invención proporciona un kit para llevar a cabo el método de la reivindicación 1, que comprende los siguientes componentes:
- un reactivo con una concentración conocida de trombina;
 - un reactivo activador para iniciar la generación de trombina, tal como una combinación de fosfolípidos y factor tisular o de fosfolípidos y ácido elálgico o de caolín o factor tisular o fosfolípidos solos;
 - 30
 - un aditivo que facilita el valor de diagnóstico del ensayo, tal como un agente protrombótico o antitrombótico, por ejemplo trombomodulina, heparina, inhibidores directos de trombina o pentasacáridos;
 - un reactivo que contiene un sustrato señalizador o un sustrato señalizador al que se ha añadido un grupo saliente que produce la señal;
 - 35
 - un programa de software que se puede cargar directamente en la memoria de una computadora capaz de realizar los pasos e) y f) de la reivindicación 1 que toma la señal medida en los pasos a) y c) de la reivindicación 1 y la señal medida en los pasos d1), d2) ó d3) de la reivindicación 1 para proporcionar los parámetros definidos en el paso b) de la reivindicación 1 y los utiliza para corregir la señal de c) de la reivindicación 1 en cuanto al color y la turbidez y la no-linealidad, calculando después la concentración de trombina con el tiempo utilizando la pendiente inicial del paso b) de la reivindicación 1 y calcula entonces a partir de estas curvas corregidas la actividad enzimática según se determina con el método aquí descrito cuando el programa es ejecutado por un
 - 40
 - ordenador;
 - una cantidad calibrada de fluoróforo a utilizar dentro o fuera del medio en el que se produce la generación de trombina;
 - 45
 - una fuente fluorescente que se puede utilizar dentro o fuera del medio en el que se produce la generación de trombina.

La muestra de plasma se selecciona de entre el grupo consistente en sangre y plasma, incluyendo plasma rico en plaquetas, pobre en plaquetas o libre de plaquetas.

50

Cuando se lleva a cabo el método de la invención con muestras de sangre, habitualmente esta sangre se recoge en tubos que contienen citrato sódico o EDTA o similar, de modo que los iones calcio en sangre libres se enlazan y se impiden la formación de trombina y la coagulación. Así, para iniciar la generación de trombina es necesario añadir calcio poco antes de comenzar con la medida. Sin embargo, si la sangre no se recoge en citrato sódico o similar, esta adición de calcio puede no ser necesaria. Por ejemplo, cuando se aplica el método de forma que es posible comenzar con el experimento en cuestión de minutos después de la toma de sangre.

55

Habitualmente, la actividad proteolítica a determinar se selecciona de entre el grupo de la actividad del factor de coagulación activada, incluyendo trombina, actividad del factor fibrinolítico activado y componente activado de la actividad del sistema de complemento activado. Una realización preferente consiste en determinar la evolución de la actividad de trombina en tiempo real a partir de una muestra de sangre o plasma de acuerdo con el método de la presente invención.

60

Preferentemente el sustrato señalizador utilizado en el presente método se selecciona de entre el grupo de compuestos que comprenden un grupo saliente, donde dicho grupo saliente proporciona un producto de conversión detectable por reacción mediante la enzima proteolítica formada. Habitualmente este producto de conversión se

determina por espectroscopía, en particular de fluorescencia (preferente), por densidad óptica y por NMR. Así, normalmente el citado grupo saliente es un grupo fluorescente, un cromóforo, un grupo que libera iones hidrógeno o similar. Un sustrato señalizador adecuado y preferente para la realización del método de la presente invención es Z-Gly-Arg-AMC. Los productos de conversión detectables adecuados incluyen, además, p-nitroanilida y 7-amino-4-metilcumarina.

Los medios adecuados de actividad proteolítica estable conocida constante para la realización del método de la presente invención tal como se ha definido anteriormente incluyen complejo de α_2 -macroglobulina-trombina (preferente), complejo de estafilocagulasa-protombina y gamma-trombina. Además se puede utilizar cualquier enzima proteolítica modificada en sus sitios de reconocimiento secundarios en el sentido de que su centro activo permanece intacto pero se suprime su interacción funcional con las proteínas de la mezcla de reacción.

Activadores de proteasa útiles para la realización del presente método incluyen iones calcio, fosfolípidos, factor tisular, factor tisular soluble, tromboplastina, caolín y ácido elálgico.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la primera muestra biológica comprende además un agente farmacéutico a ensayar en cuanto a su influencia sobre el sistema proteolítico que se está estudiando, tal como el sistema hemostático-trombótico. Agentes farmacéuticos adecuados que se pueden ensayar con el presente método son agentes antitrombóticos, por ejemplo agentes antiplaquetarios y anticoagulantes como heparina, sulfato de dermatán, un inhibidor directo de trombina, por ejemplo hirudina, argatroban o melagatrán y un inhibidor del factor Xa, por ejemplo proteína anticoagulante de garrapata.

Estos y otros objetos de la presente invención se explicarán más en detalle más abajo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: ilustra una señal en función del tiempo de una mezcla de reacción que contiene trombina y un sustrato señalizador.

Figura 2: muestra un rango de concentración de fluoróforo (amino metil cumarina, AMC) en solución tampón y plasma. Debido a un efecto interno de filtrado (IFE) la curva se desvía. También se puede observar que la cantidad de señal a la misma concentración de fluoróforo es sustancialmente diferente para los dos diferentes medios.

Figura 3: a) una curva de calibración (línea negra curvada), b) la misma curva corregida para IFE (línea discontinua) y c) la misma curva corregida para IFE y también para el consumo de sustrato (línea recta). La curva original se ha dibujado de acuerdo con los valores del eje izquierdo (unidades de fluorescencia, FU). La curva en línea discontinua se calcula a partir de la relación entre las concentraciones fluorescentes y de AMC según se puede observar en la Figura 2.

Figura 4: muestra las curvas de la medida de la misma actividad de concentración de trombina en diferentes plasmas.

Figura 5: muestra la relación entre la pendiente inicial de las curvas y sus cotas finales.

Figura 6: muestra la relación entre la densidad óptica de plasmas de diferentes donantes y la cota final de la curva de calibración medida en los mismos plasmas.

Figura 7: dibujo de una disposición posible donde la medida de un solo punto es determinada por una fuente fluorescente que se coloca por debajo del pocillo de microtitulación

Figura 8A: muestra los valores de fluorescencia sin corregir y corregidos de una medida de generación de trombina en plasma.

Figura 8B: muestra una medida de la trombina en una solución tampón. La línea discontinua muestra la corrección de la señal para IFE y el consumo de sustrato.

Figura 9: muestra los valores, calculados de acuerdo con la presente invención, de la trombina en función del tiempo antes (línea fina) y después (línea gruesa) de la corrección para la actividad amidolítica de a2M-IIa.

Definiciones

El término "actividad transitoria" tal como se utiliza en la presente en relación a las enzimas proteolíticas presentes en una muestra de sangre o plasma se refiere al hecho de que la actividad enzimática, una vez iniciado el proceso fisiológico con los medios conocidos en la técnica, surge primero y se desactiva de nuevo después hasta alcanzar una actividad (cerca de) cero al final.

El término "medio biológico" según se utiliza aquí, también llamado "medio" según el caso, se refiere a plasma, plasma con células de sangre o sangre pura o cualquier otro fluido de origen corporal u otro en el que se produce el proceso biológico de activación e inactivación enzimática.

El término "medida de un solo punto" (SPM) se refiere a una técnica donde se mide una señal durante un tiempo corto a diferencia de una serie de medidas en las que se sigue el cambio de la señal en función del tiempo. Un SPM puede realizarse de forma repetida y después promediarse o se puede realizar solamente una vez.

Tal como se utiliza aquí, el término "sustrato señalizador" se refiere a un sustrato que es disociado por la o las enzimas proteolíticas presentes en el medio, del cual se separa un grupo saliente que se puede detectar por métodos ópticos, NMR u otros métodos. Grupos salientes que se pueden detectar ópticamente son, por ejemplo, p-nitroanilida y 7-amido-4-metilcumarina; la p-nitroanilida absorbe a 405 nm y la 7-amido-4-metilcumarina es fluorescente (excitación a 350 nm y emisión a 460 nm). Ejemplos de grupos salientes activos para NMR son aquellos que contienen ^{31}P , ^{13}C o cualquier otro átomo detectable por NMR o por técnicas similares. También se pueden utilizar iones H^+ como grupo saliente, que se detectan midiendo cambios de pH. También se pueden utilizar sustratos amperométricos donde la enzima, cuya concentración se controla en función del tiempo, provoca un cambio del sustrato añadido a la mezcla de reacción que se puede seguir midiendo la conductividad eléctrica.

10 Descripción detallada de la invención

Según se ha mencionado anteriormente, un método establecido para determinar la formación de enzimas en una muestra de un medio biológico es añadir un sustrato señalizador específico para tal enzima al medio y controlar la señal con el tiempo. Esta señal no sólo depende del cambio de concentración de la enzima, sino también de varios parámetros dependientes e independientes del medio. Los parámetros dependientes del medio incluyen la turbidez y el espectro de absorción (por ejemplo el color) de dicho medio. Los parámetros independientes del medio incluyen la concentración de enzimas, del sustrato, parámetros de cinética enzimática del sustrato señalizador con respecto a las enzimas (como K_m y k_{cat}), de las técnicas de medida, los materiales donde se encuentra el medio durante la medida, de los volúmenes utilizados y similares.

La WO 03/093831 describe que, con el fin de corregir estos efectos, se añade una cantidad calibrada de enzimas al medio. La adición de sustrato señalizador resultará entonces en una señal donde se pueden observar las influencias dependientes e independientes del medio. Esta medida se utiliza entonces para calcular la cantidad desconocida de enzima que se forma en (otra muestra de) el medio biológico. Es decir, esta curva sirve como "curva de calibración" que contiene toda la información necesaria para traducir la señal en una concentración enzimática en función del tiempo y que se forma durante la reacción biológica en otra muestra del mismo medio. En esta disposición es necesario medir la curva de calibración en un medio con el mismo color y la misma turbidez en el que se produce la formación de enzimas. Esta es la forma óptima para corregir las influencias dependientes del medio sobre la señal.

La presente invención proporciona un método fiable, rápido y conveniente para determinar el cambio de la concentración de enzimas en función del tiempo en un medio biológico en presencia de un sustrato señalizador, realizándose correcciones apropiadas en cuanto al consumo de sustrato, la dependencia de la señal del color y la no-linealidad entre la concentración del cromóforo o fluoróforo y la cantidad de señal. La señal que se mide se corregirá para los efectos diferentes de cada muestra (variabilidad en función de la muestra) y para aquellos efectos que son los mismos para todas las muestras medidas bajo condiciones similares. Tales variabilidades incluyen efectos del consumo de sustrato, el efecto filtrante interior, efectos específicos instrumentales, efectos dependientes de la disposición experimental y otros. La clave de esta invención es medir la variabilidad independiente de la muestra por separado de la variabilidad dependiente de la muestra. Entonces la variabilidad dependiente de la muestra puede medirse de forma más conveniente y fácil.

Esta medida de un solo punto consiste en una medida de alguna fuente productora de señal desde la cual la señal atraviesa el medio de modo que la cantidad de señal es una medida del color y/o la turbidez del medio. En esencia, el método comprende medir una curva de calibración en un medio adecuado, tal como una solución tampón, para determinar las características de la curva medida. Estas características describen la variabilidad independiente de la muestra y permiten así obtener esta curva completa o una parte suficiente de la curva de nuevo mediante un procedimiento matemático basado en una medida de un solo punto de la variabilidad dependiente de la muestra en una muestra del medio donde se produce la generación de enzimas. La gran ventaja de este método es que no es necesario medir la curva de calibración completa en cada muestra individual del medio, siendo una medida de un solo punto adecuada. Esta medida de un solo punto debería ser una medida de la variabilidad de la señal causada por el propio medio. Podría comprender la medida de una concentración fija de fluoróforo en el medio biológico, cuyo resultado es una medida de las diferencias donante-a-donante en cuanto al color del plasma.

Durante la coagulación aparece y desaparece la trombina en y del plasma. Cuando se añade a esta reacción un sustrato fluorogénico adecuado, se puede controlar la fluorescencia en función del tiempo y, en base a esta fluorescencia, se puede calcular la concentración de trombina. Sin embargo, la señal medida sufre una no-linealidad del sistema debido al consumo del sustrato y a la relación no lineal entre la cantidad de fluoróforo que es producido y la magnitud de la fluorescencia. Esto se puede observar en la Figura 1, donde se mide con un fluorómetro una cantidad fija de trombina en una solución tampón en presencia del sustrato fluorogénico Z-Gly-Gly-Arg-AMC, se muestra claramente una curva que se desvía. Una curva de este tipo tiene típicamente tres características: su pendiente inicial (1), su cota final (2) y su curvatura (3).

Pendiente inicial (1)

La pendiente inicial depende, entre otros, del color del medio en el que se controla la reacción, de la concentración del sustrato y de la concentración de trombina. Por definición, la pendiente inicial no sufre de los efectos del

consumo de sustrato y del efecto de filtrado interior, ya que en el momento cero no se consume sustrato alguno y no se genera ningún fluoróforo. Así, la pendiente inicial da la traducción entre las Unidades de Fluorescencia (FU) por minuto y la concentración de enzimas: $FU/min \times C = [trombina]$. Esta C puede utilizarse sólo para calcular la trombina en función del tiempo en la muestra donde se produce la generación de trombina cuando se corrige la señal, de modo que durante toda la reacción C permanece como un valor fijo.

Nivel final (2)

Cuando se alcanza la meseta se ha consumido por completo el sustrato y/o el sistema ha alcanzado su límite de fluorescencia, es decir más fluoróforo no produce más señal.

Por tanto, la cantidad medida de fluorescencia en el nivel final depende de la concentración de fluoróforo y del límite del sistema. Este nivel final depende también del color del medio donde se mide la fluorescencia.

Curvatura (3)

La curvatura depende de la no linealidad entre la cantidad de fluoróforo y la cantidad de señal de fluorescencia, así como del consumo de sustrato. Con frecuencia, la relación entre la concentración de fluoróforo y la cantidad de fluorescencia medida no es lineal, debido al hecho de que al aumentar la concentración de fluoróforo se produce relativamente menos fluorescencia (efecto de filtrado interior). Un segundo efecto es la conversión del sustrato, que conduce a una reducción de su concentración (véanse las Figuras 2 y 3). Cuando estas concentraciones de sustrato quedan por debajo o cerca de la K_m del sustrato, la velocidad con la que la trombina convierte el sustrato disminuye al reducirse éste. Dependiendo de la elección del sustrato, la enzima medida y el sistema de medida, la curvatura puede ser fuerte o estar ausente.

La Figura 4 muestra un ejemplo de una medida de la misma concentración de la actividad de trombina (derivado del complejo alfa2-macroglobulina-trombina ($\alpha 2M-IIa$) medida en plasma de diferentes donantes. En esta figura se evidencia que 1) la misma actividad enzimática en estos diferentes plasmas muestra grandes variaciones y que 2) todas las curvas se doblan hacia una meseta. Estas curvas contienen toda la información necesaria para corregir las diferencias entre donantes en cuanto al color del plasma, así como la no-linealidad del sistema. Las curvas de la Figura 4 pueden ajustarse matemáticamente de acuerdo con la fórmula:

$$FU(t) = FU(0) + MAX*(1 - EXP(-time*K)),$$

donde $FU(t)$ es la fluorescencia en función del tiempo; $FU(0)$ es la fluorescencia inicial; MAX es el nivel final y K describe la curvatura.

Aunque esta fórmula logarítmica proporciona un buen ajuste aproximado, se pueden utilizar fórmulas matemáticas alternativas tales como funciones polinomiales, hipérbolas o combinaciones de las mismas, u otras alternativas. La fórmula que se utiliza no es crucial, se necesita únicamente para poder describir la curva de modo que se pueden realizar correcciones de diferencias de color y de curvatura del medio que se utiliza.

Sorprendentemente la Figura 5 muestra una relación excelente entre la pendiente inicial de cada curva y su nivel final. Una vez establecida esta relación, se puede calcular la pendiente inicial tan solo a partir de los valores del nivel final. La curvatura, descrita por el parámetro K, es idéntica para todas las curvas y no está sometida a la influencia del color del medio. Por esta razón K, sometida a la influencia de factores del sistema tales como el consumo de sustrato y el efecto de filtrado interior, sólo debe medirse una vez. Después se pueden generar las curvas midiendo sólo el nivel final. Este nivel final se mide en aquella situación donde se convierte todo el sustrato en fluoróforo. La adición de esta cantidad de fluoróforo a cada plasma individual, en lugar de la adición de una combinación del sustrato fluorogénico con enzimas, también resultaría en la misma magnitud de señal. Esto significa que, una vez conocida K y el nivel final de una medida de un solo punto de adición de fluoróforo, se puede generar la curva completa para cada plasma individual, como si estas curvas se hubieran medido en todos estos plasmas individuales.

Una vez conocida K y medido el nivel final se pueden corregir los valores de conversión del sustrato señalizador derivados de las curvas de generación de enzimas. Esta invención propone utilizar sólo medidas de un solo punto, determinado en cada plasma individual, con el fin de corregir la influencia del color del medio. Esta medición de un solo punto también se puede utilizar para corregir las curvas en cuanto a su no-linealidad. Aunque la medición del nivel final sea probablemente el parámetro más preciso para corregir la no-linealidad del sistema, se puede utilizar cualquier valor dentro de la curva para describir la curva completa. Por ejemplo, si se sabe que el valor de la señal de la curva es del 50% del nivel final, se puede extrapolar e interpolar el resto de la curva mediante una fórmula matemática adecuada. Cuando más cerca se encuentre el valor del nivel final tanto más precisa será el ajuste. En caso de curvas de calibración que no se inclinan hacia un punto superior o en caso de una no-linealidad poco importante del sistema, las mediciones de un solo punto pueden todavía utilizarse para corregir solamente el color. En el último caso no se utiliza el valor del parámetro K.

La medición de la generación de trombina en el plasma es una herramienta excelente para determinar la funcionalidad del sistema trombotico-hemostático. Como se ha mencionado anteriormente, la WO 03/093831 describe un método para medir la generación de trombina en un plasma en coagulación. Este método es ampliamente utilizado actualmente y, en la práctica normal, incluye una detección fluorométrica. El plasma se divide en dos muestras, en una de las muestras se activa la generación de trombina (muestra TG) y a la otra muestra se añade una cantidad calibrada de actividad $\alpha 2M-IIa$. Ambas muestras reciben la misma cantidad de sustrato fluorogénico y se controla la fluorescencia en un fluorómetro. La curva de calibración (similar a la Figura 1) se inclina debido al efecto de filtrado interior y al consumo del sustrato. En base a la curva de calibración se puede calcular la cantidad de trombina que se forma en la muestra TG en función del tiempo:

- 5
- 10 a) pueden emplearse los parámetros necesarios para "enderezar" la curva de calibración para realizar las correcciones de la señal de fluorescencia obtenida de la muestra TG, véase más abajo la Figura 8A. La precisión de esta corrección aumenta con mediciones más largas de la curva de calibración; es decir, cuanto más se acerca la medida al nivel final de la curva, con tanta más precisión se pueden estimar los parámetros matemáticos requeridos para la corrección. Esto significa que se necesita un tiempo mínimo para medir la curva,
- 15 en la práctica actual como mínimo 20 minutos. El software comercial de Thrombinoscope BV, Holanda (www.thrombinoscope.com) calcula, para cada cantidad de fluorescencia en la curva del TG, un valor corregido de fluorescencia. Entonces se sustituyen los valores medidos de la fluorescencia en la muestra TG por los valores corregidos.
- 20 b) a partir de la curva de calibración se puede derivar una curva de conversión mediante la cual se puede multiplicar la primera derivada de la fluorescencia en función del tiempo de la muestra TG, FU/min (unidades de fluorescencia por minuto) con el fin de obtener la concentración de trombina, ya que se midió la curva de calibración a una magnitud conocida de actividad de trombina.

Se debe tener presente que los parámetros de a) de hecho no dependen del color o de la turbidez del medio. Sin embargo, debido a que la señal cambia con el color del medio, la WO 03/093831 enseña que, en el método revelado, se debería medir la curva de calibración (en otra muestra) del mismo plasma en el que se produce la generación de trombina (la muestra TG). Debido a que la señal es considerablemente diferente entre donantes a causa de las variaciones del color del plasma, la curva de calibración debe medirse para cada plasma individual. El factor de conversión mencionado en b) depende del color del plasma en el que se mide la fluorescencia.

25 La presente invención proporciona una mejora del ensayo de generación de trombina descrito en la WO 03/09831, ya que permite la corrección en cuanto al color y la turbidez del plasma.

De acuerdo con la invención se necesita sólo una medida en la muestra de plasma para obtener la información suficiente con el fin de corregir las variaciones de color y/o el efecto de filtrado interior y el consumo de sustrato en la muestra. En el fluorómetro utilizado se necesita una medición en cualquier medio adecuado para determinar las características de la curva de calibración. Una vez conocidas, sólo es necesario realizar una medición de un solo punto para cada color del medio. Esta medición de un solo punto puede realizarse de varias formas, por ejemplo:

- 35
2. Medida de la densidad óptica del medio. Existe una gran relación entre las variaciones de densidad óptica, medida a la longitud de onda apropiada, en diferentes plasmas, y los diferentes niveles finales o pendientes iniciales de las curvas de calibración (Figura 6). Una medida de la DO sólo requiere unos pocos segundos o menos y una vez determinada la relación se puede proceder a la corrección.
 - 40 3. Se puede añadir fluoróforo al plasma, la magnitud de fluorescencia medida depende del color del plasma. La magnitud de fluorescencia proporcionará una medida excelente para el nivel final o las pendientes iniciales de la curva de calibración. El valor medido equivaldrá al nivel final cuando la magnitud de fluorescencia es equivalente a la cantidad de sustrato. También son adecuadas concentraciones inferiores de fluoróforo, siempre que quede establecida la relación entre la medición de un solo punto y la variabilidad de fluorescencia debida al color de los diferentes medios. Incluso a una concentración cero de fluoróforo, esto es midiendo la fluorescencia solo del plasma, el valor medido depende del color del mismo. Sin embargo, la adición de fluoróforo aumenta en gran medida la precisión de la corrección. Un modo conveniente de adición de fluoróforo a cada plasma es la añadir fluoróforo al sustrato fluorogénico mismo. Por ejemplo, si se añade una concentración de fluoróforo equivalente a un 5% de la concentración inicial de sustrato, la medición muestra un cierto desfase de los valores de fluorescencia en el momento cero. Este desfase será una medida excelente de cómo el color y la turbidez de la muestra influyen sobre la señal y puede utilizarse para corregir estos efectos. De ello resulta la gran ventaja que la propia muestra de plasma en la que se produce la generación de trombina puede utilizarse también para la calibración. Con ello se reduciría la cantidad mínima de muestras necesarias para realizar el ensayo y aumentaría el rendimiento de la medición.
 - 50 4. Se puede colocar una fuente de fluorescencia de modo que la luz de excitación deba atravesar la muestra para alcanzar la fuente y/o la emisión de luz deba atravesar la muestra para alcanzar el detector. Se puede colocar, por ejemplo, una cubeta transparente que contiene el plasma cerca de una cubeta que contiene fluoróforo. Cuando la luz emitida pasa primero a través de la muestra y después impacta en la solución de fluoróforo, entonces la medida será proporcional a las variaciones de color de la muestra. En lugar de la
- 60

solución de fluoróforo, se pueden utilizar otras fuentes de fluorescencia, como puede ser un fluoróforo fluorescente seco unido a un material adecuado o a una malla o gel o una gasa o un material absorbente que se ha convertido en fluorescente, a los que se añade plasma, plasma rico en plaquetas o sangre pura. En la Figura 7 se muestra una disposición posible donde se utiliza una placa de microtitulación. En este ejemplo se coloca la fuente fluorescente fuera y por debajo del pocillo de microtitulación.

Además, la invención proporciona un kit para la realización del método de la presente invención según se ha indicado anteriormente. Este kit comprende, convenientemente, uno o más de los siguientes componentes, en contenedores apropiados o en otros medios de embalaje convencionales:

- un reactivo con una concentración conocida de trombina;
- un reactivo activador para iniciar la generación de trombina, tal como una combinación de fosfolípidos y factor tisular o fosfolípidos y ácido elálgico, o caolín o factor tisular o fosfolípidos solos;
- un aditivo que facilita el valor de diagnóstico del ensayo, tal como un agente protrombótico o antitrombótico, por ejemplo trombomodulina, heparina, inhibidores directos de trombina o pentasacáridos;
- un reactivo que contiene un sustrato señalizador o un sustrato señalizador que lleva un grupo saliente productor de señal;
- un programa de software que se puede cargar directamente en la memoria de una computadora capaz de realizar los pasos e) y f) de la reivindicación 1, que toma la señal medida en los pasos a) y c) de la reivindicación 1 y la señal medida en el paso e) de la reivindicación 1 con el fin de proporcionar los parámetros definidos en el paso b) de la reivindicación 1 y los utiliza para corregir la señal de c) de la reivindicación 1 en cuanto al color y la turbidez y la no-linealidad y calcula, entonces, la concentración de trombina en función del tiempo utilizando la pendiente inicial del paso b) de la reivindicación 1, empleando estas curvas corregidas para calcular la actividad enzimática según se determina por el método aquí descrito cuando dicho programa es ejecutado por una computadora;
- una cantidad calibrada de fluoróforo a utilizar dentro o fuera del medio en el que se produce la generación de trombina;
- una fuente de fluorescencia que se puede utilizar dentro o fuera del medio en el que se produce la generación de trombina.

El kit puede comprender convenientemente reactivos liofilizados.

La invención se explica además con ayuda del siguiente ejemplo, el cual no se ha de considerar como una limitación del alcance de la invención en cualquier sentido.

Ejemplo

La Figura 8A muestra la señal fluorescente no corregida medida en una mezcla de reacción que contiene 2/3 de plasma pobre en plaquetas, 416 μM de sustrato de trombina fluorogénico Z-G-G-R-AMC, 4 μM de vesículas de fosfolípidos procoagulantes y 5 pM de factor tisular recombinante. La reacción se inicia en el momento cero por la adición al plasma citrado de un sustrato fluorogénico y calcio. La línea discontinua muestra la señal corregida para esta reacción para la que se hizo una corrección en referencia al efecto del filtrado interior y del consumo de sustrato.

La Figura 8B muestra una medición de 100 nanomoles de trombina en solución salina con tampón Hepes pH 7,35. Esta curva de calibración se ajusta matemáticamente según la fórmula $FU(t) = FU(0) + \text{MAX} \cdot (1 - \exp(-K \cdot t))$. Se utiliza una medición de un solo punto de la concentración de fluoróforo, que equivale a la concentración de sustrato en otra muestra del mismo plasma que el plasma en el que se produce la generación de trombina, con el fin de corregir la señal fluorescente de la Figura 8A utilizando la fórmula:

$$FU_{\text{corrected}} = -SPM \cdot \ln[FU(0) + SPM - FU] + SPM \cdot \ln(SPM) + FU(0)$$

donde SPM es la medición de un solo punto de la fluorescencia; $FU(0)$ es la fluorescencia en el momento cero de la reacción y FU es el valor de fluorescencia sin corregir.

Aplicando esta fórmula, se transforma la curva de calibración en una línea recta (8B, línea discontinua). Esta línea recta se aproxima bastante a la pendiente inicial de la curva. La primera derivada de la curva corregida de la Figura 8A (Figura 9) debe traducirse de FU por minuto a trombina nanomolar en función del tiempo. Para ello, se calcula la pendiente inicial desde la medición de un solo punto SPM utilizando la fórmula: pendiente inicial = $SPM \cdot K$, donde K se calcula en base a la medición de la Figura 8B. Así, en cada medio se necesita solamente una medida de un punto único para corregir el comportamiento no-lineal de la señal fluorescente, así como para la conversión de la velocidad del aumento de fluorescencia (FU/min) a concentración de trombina. Finalmente, es necesario corregir la curva de

generación de trombina en cuanto a la proporción de conversión del sustrato no provocada por la trombina, sino por la actividad amidolítica del complejo $\alpha 2M-IIa$.

- 5 En este ejemplo se midió la curva de calibración completa hasta alcanzar el nivel final, lo que significa que el valor de SPM en la fórmula equivale al nivel final. Sin embargo, no es necesario completar la medición, con el ajuste matemático puede obtenerse una aproximación razonable del nivel final por extrapolación. Alternativamente, toda la información necesaria para realizar la corrección puede obtenerse midiendo solamente la pendiente inicial de la curva de calibración $V(0)$ lo que requiere sólo unos pocos minutos para ser completada y, además, medir la cantidad de fluoróforo que equivale a la concentración del sustrato en una mezcla de reacción que contiene la misma solución tampón que la mezcla en la que se midió la curva de calibración. Esta medición proporciona un valor FU_{max} que
- 10 proporciona inmediatamente la magnitud de fluorescencia en el nivel final de la curva de calibración. El parámetro K arriba descrito equivale a $-V(0)FU_{max}$. De esta forma se mide K en pocos minutos. Según se explica más arriba, esta K no depende de la diferencia de color del medio. Tampoco es necesario aquí medir la concentración de fluoróforo que concuerda exactamente con la concentración del sustrato, cuanto más cerca quede la concentración de la concentración del sustrato tanto más precisa puede ser la descripción de toda la curva.
- 15 La presente invención proporciona un método conveniente para determinar en tiempo real la evolución de la actividad proteolítica en una muestra de un medio biológico, en particular la actividad de trombina en sangre o plasma o en plasma rico en plaquetas, que se corrige en cuanto a los parámetros independientes del medio, pero también en cuanto a los parámetros dependientes del medio, tal como turbidez y color del medio, proporcionando así un modo fiable, elegante y sencillo de medir la actividad proteolítica en muestras con ayuda de una medición de
- 20 un solo punto en cada muestra y una curva de calibración que se mide sólo una vez en un medio adecuado, tal como una solución tampón.
- Este método de ensayo es útil, por ejemplo, para medir la evolución temporal de la actividad de trombina *in vitro*, es decir medir la trombina activa en una muestra después de su generación o a medida que se desarrolla en una muestra en coagulación de sangre pura o de plasma con contenido en plaquetas o de plasma sin plaquetas.
- 25 También es útil para controlar el estado de un paciente, incluyendo la detección o el control de un estado patológico relacionado con una deficiencia de la coagulación sanguínea. Por otro lado, es útil para la detección de substancias, incluyendo la detección de medicamentos, que pueden interactuar con el proceso de coagulación, especialmente con la actividad de trombina.
- 30 La presente descripción debe considerarse en todos los sentidos como ilustrativa y no limitativa, definiéndose el alcance de la invención en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar el desarrollo de la actividad de trombina en función del tiempo en una muestra de plasma, según aparece y desaparece de la muestra, que comprende los siguientes pasos:
- 5 a) añadir un sustrato señalizador a una mezcla de reacción que contiene una cantidad predeterminada de actividad de trombina, donde dicho sustrato señalizador genera una señal detectable relacionada con el producto de conversión formado después de la reacción con dicha actividad de trombina y medir la señal detectable;
 - 10 b) proporcionar una curva que muestra la evolución con el tiempo del desarrollo de la señal en dicha mezcla de reacción y determinar la pendiente inicial de la curva, su nivel final y su curvatura;
 - c) añadir un sustrato señalizador a dicha muestra de plasma donde se produce la generación de trombina, generando dicho sustrato señalizador una señal detectable relacionada con el producto de conversión formado después de la reacción con la trombina, y medir dicha señal detectable para obtener una curva que muestra la intensidad de fluorescencia en función del tiempo;
 - 15 d1) añadir un compuesto fluorescente a la misma muestra mencionada en el paso c), o a otra muestra del mismo plasma donde se produce la generación de trombina, para obtener una señal detectable a utilizar como medida para la influencia de la turbidez y/o del color del plasma sobre la señal; o
 - 20 d2) medir la densidad óptica de la misma muestra mencionada en el paso c), o de otra muestra del mismo plasma donde se ha producido la generación de trombina, para obtener una medida en cuanto a la influencia de la turbidez y/o del color del plasma sobre la señal, o
 - d3) proporcionar una fuente fluorescente y colocar dicha fuente fluorescente de manera que la luz de excitación atraviese la muestra de sangre o plasma hasta la fuente y/o de manera que la luz emitida atraviese dicha muestra para alcanzar el detector, y medir la señal detectada, para obtener una medida en cuanto a la influencia de la turbidez y/o del color provocada por el plasma en la señal;
 - 25 e) comparar la medida de las señales detectadas en cualquiera de los pasos d1), d2) y d3) con la medida de las señales detectadas en el paso a) para obtener un factor de corrección para la turbidez y el color del plasma en el que se produce la generación de trombina, y
 - 30 f) utilizar la curvatura del paso b) para corregir no-linealidades en la curva del paso c) usando el factor de corrección del paso e) para corregir la curva del paso c) en cuanto a la turbidez y el color del plasma y utilizar la pendiente inicial del paso b) para calcular la concentración de trombina en función del tiempo a partir de la curva del paso c) con el fin de determinar el desarrollo de la actividad de trombina.
- 35 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque se añade un activador de proteasa a la citada muestra de plasma antes del paso c) para generar una actividad proteolítica.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque dicha muestra de plasma se selecciona de entre el grupo consistente en sangre, plasma, incluido plasma rico en plaquetas, plasma pobre en plaquetas o plasma libre de plaquetas.
- 40 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el sustrato señalizador se selecciona de entre el grupo consistente en compuestos que comprende un grupo saliente, dando dicho grupo saliente un producto de conversión detectable bajo la reacción por la actividad de trombina formada.
5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque el sustrato señalizador es el sustrato fluorogénico Z-Gly-Gly-Arg-AMC.
- 45 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el producto de conversión detectable se determina mediante espectroscopía, en particular de fluorescencia, por densidad óptica y por NMR, o por conductividad eléctrica.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el grupo saliente es un grupo fluorescente, un grupo cromóforo o un grupo que libera iones hidrógeno.
- 50 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el producto de conversión detectable es p-nitroanilida ó 7-amino-4-metilcumarina.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el activador de proteasa se selecciona de entre el grupo consistente en iones calcio, fosfolípidos, factor tisular, factor tisular soluble, tromboplastina, caolín y ácido elágico.
- 55 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la muestra de plasma comprende además un agente farmacéutico a ensayar en cuanto a su influencia sobre el sistema proteolítico en estudio.

11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho sistema proteolítico es un sistema hemostático-trombótico.
12. Método según la reivindicación 10 ó 11, caracterizado porque el agente farmacéutico es un agente antitrombótico, tal como un agente antiplaquetario o anticoagulante.
- 5 13. Método según la reivindicación 12, caracterizado porque el agente antitrombótico se selecciona de entre el grupo consistente en heparina, sulfato de desmatán, un inhibidor directo de trombina, por ejemplo hirudina, argatrobano o melagatran, un inhibidor de factor Xa, por ejemplo una proteína anticoagulante de garrapata.
- 10 14. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque en el paso d3) la fuente fluorescente es una solución de fluoróforo o un fluoróforo de fuente fluorescente seca unido a un material o una malla o gel o gasa o un material absorbente que se ha hecho fluorescente y al que se añade la sangre o el plasma.
- 15 15. Kit adecuado para realizar el método para determinar la evolución de la actividad de trombina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende los siguientes componentes:
- un reactivo con una concentración conocida de trombina;
 - un reactivo activador para iniciar la generación de trombina, tal como una combinación de fosfolípidos y factor tisular o fosfolípidos y ácido elálgico o caolín o factor tisular o fosfolípidos solos;
 - un aditivo que facilita el valor de diagnóstico del ensayo, tal como un agente protrombótico o antitrombótico, por ejemplo trombomodulina, heparina, inhibidores directos de trombina o pentasacáridos;
 - un reactivo que contiene un sustrato señalizador o un sustrato señalizador al que se ha añadido el grupo saliente que produce la señal;
 - un programa de software que se puede cargar directamente en la memoria de una computadora capaz de realizar los pasos e) y f) de la reivindicación 1 que toma la señal medida en los pasos a) y c) de la reivindicación 1 y la señal medida en los pasos d1), d2) ó d3) de la reivindicación 1 para proporcionar los parámetros definidos en el paso b) de la reivindicación 1 y los utiliza para corregir la señal de c) de la reivindicación 1 en cuanto al color y la turbidez y la no-linealidad y calcula después la concentración de trombina en el tiempo utilizando la pendiente inicial del paso b) de la reivindicación 1 y tomando entonces estas curvas corregidas para calcular la actividad enzimática tal como se determina en el método aquí descrito, cuando se ejecuta dicho programa por un ordenador;
 - una cantidad calibrada de fluoróforo a utilizar dentro o fuera del medio en el que se produce la generación de trombina;
 - una fuente fluorescente que se puede utilizar dentro o fuera del medio en el que se produce la generación de trombina.
- 20
- 25
- 30
16. Kit según la reivindicación 15, que comprende reactivos liofilizados.
- 35 17. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la pendiente inicial, la curvatura y el nivel final citado en el paso b) se determinan mediante el ajuste del curso temporal de la evolución de la señal de acuerdo con la fórmula:

$$FU(t) = FU(0) + MAX*(1-exp(K*t))$$

donde FU(t) es la fluorescencia en función del tiempo de la curva según se menciona en el paso b), FU(0) es la fluorescencia al inicio de la medida, MAX es el nivel final y K es una constante,

para obtener MAX+FU(0) como nivel final, K como una medida del grado de curvatura y -MAX*K como la pendiente inicial.

- 40
18. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la corrección de las no-linealidades mencionadas en el paso f) se realiza en base a los valores de la fluorescencia medida en el paso c) y su incorporación en la fórmula:

$$FU_corrected = -SPM*LN[FU(0) + SPM - FU] + SPM*LN(SPM) + FU(0)$$

45 donde FU-corrected es el valor de fluorescencia después de corregir la no-linealidad del paso f), SPM es la medición de un solo punto como medida de la influencia de la turbidez y/o del color causada por el plasma sobre la señal del paso d); FU(0) es la fluorescencia en el momento cero de la reacción medida en el paso c) y FU es el valor de fluorescencia medido en el paso c).

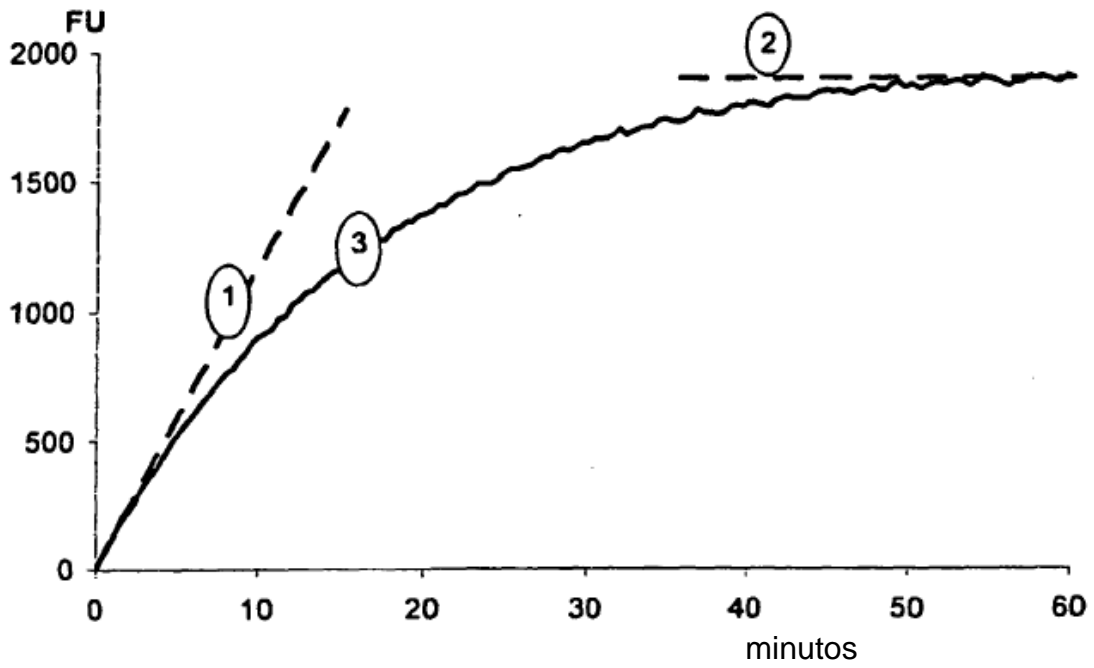


Fig. 1

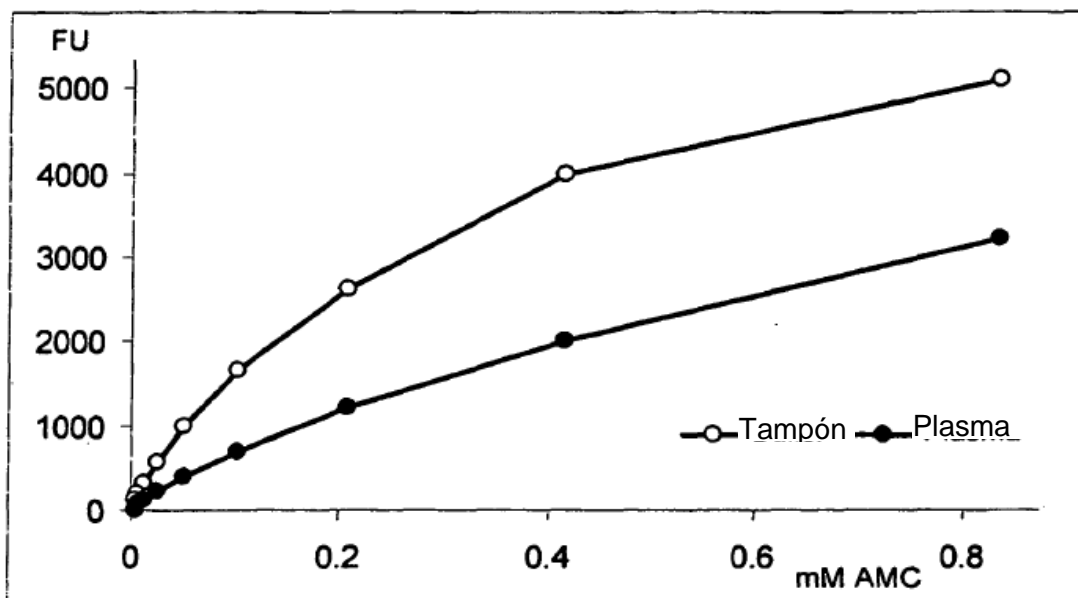


Fig. 2

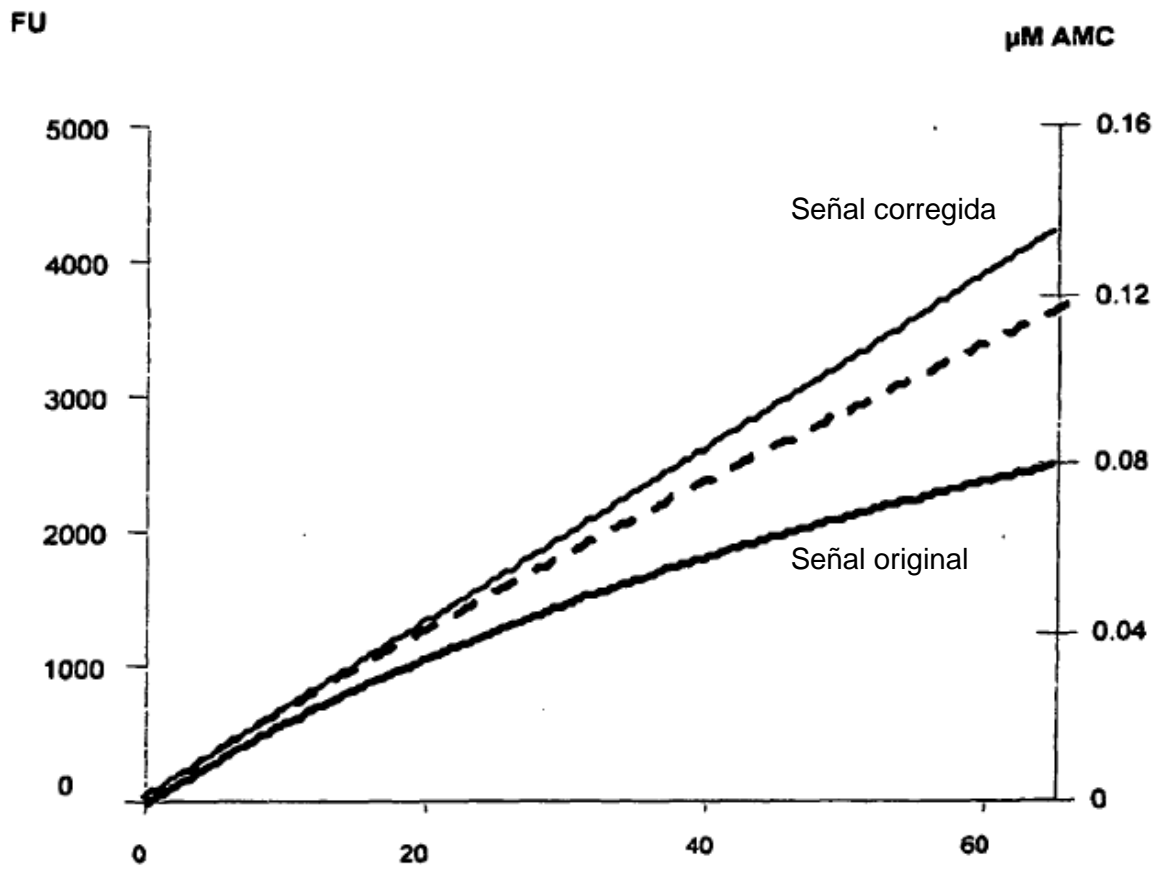


Fig. 3

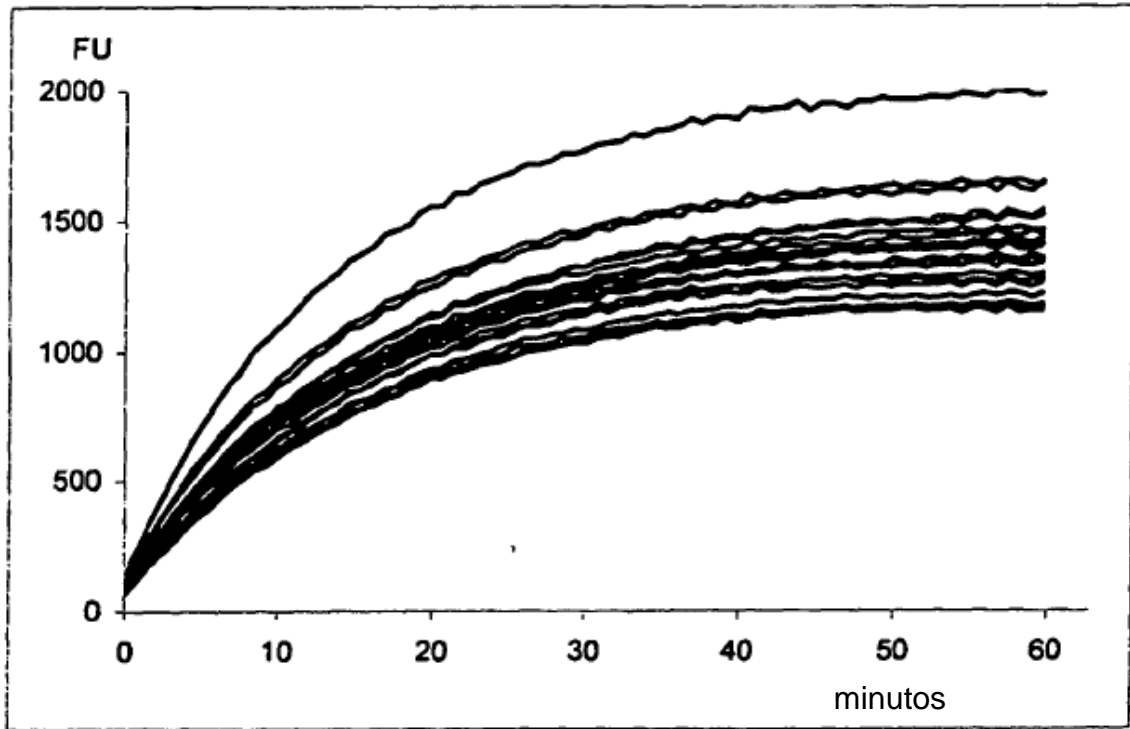


Fig. 4

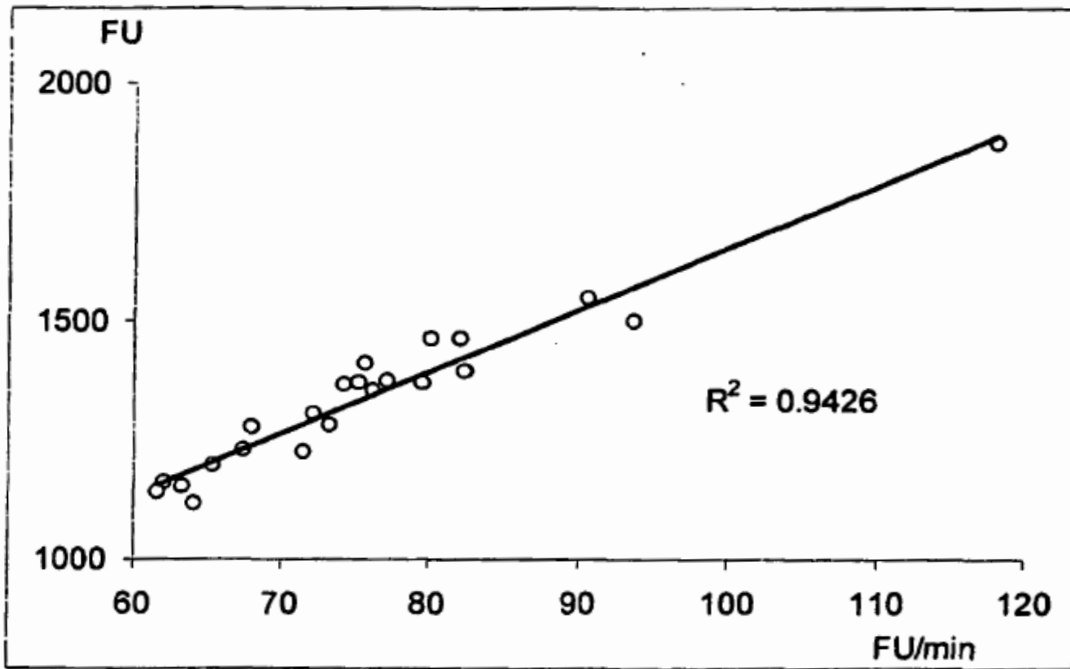


Fig. 5

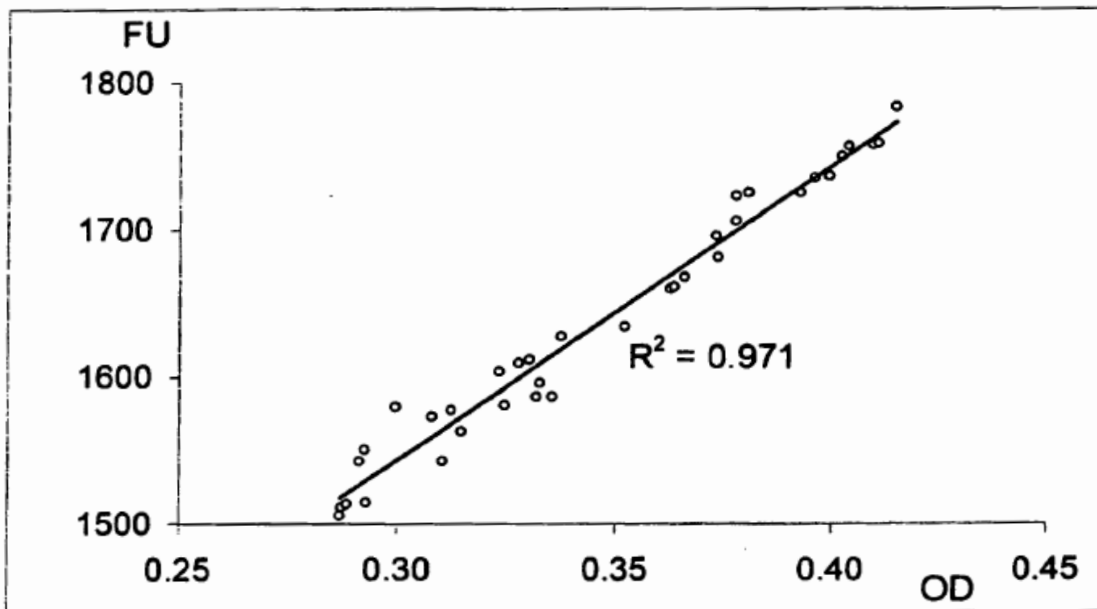


Fig. 6

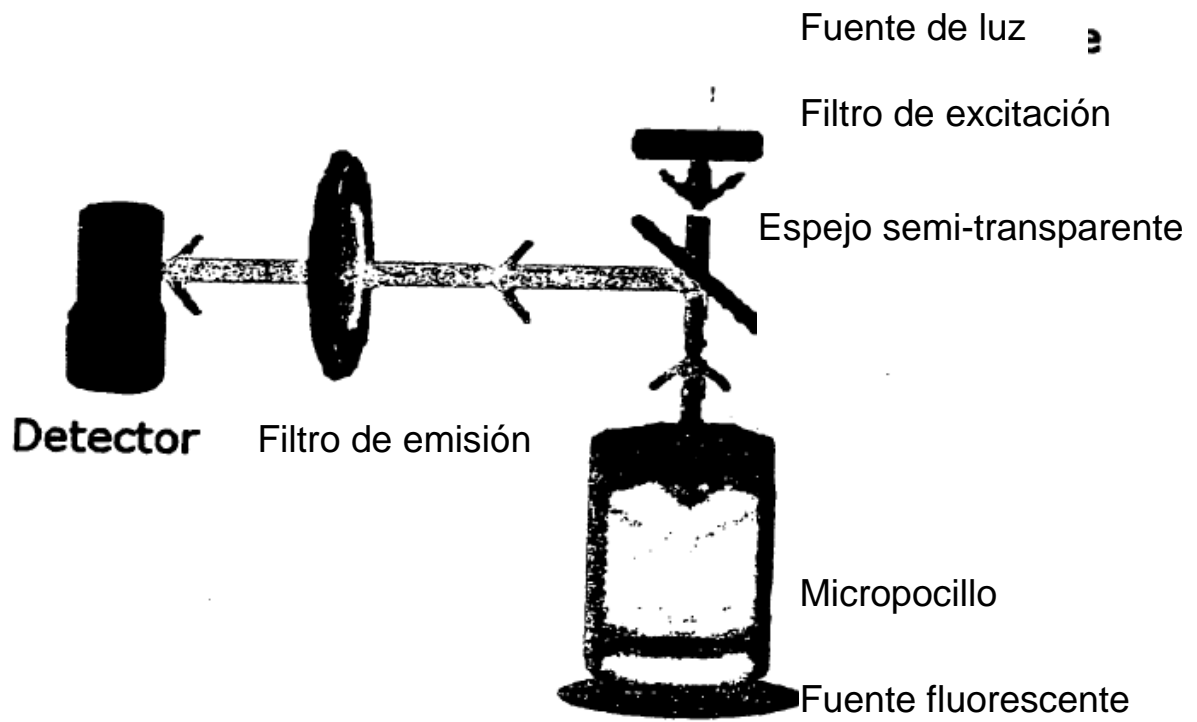


Fig. 7

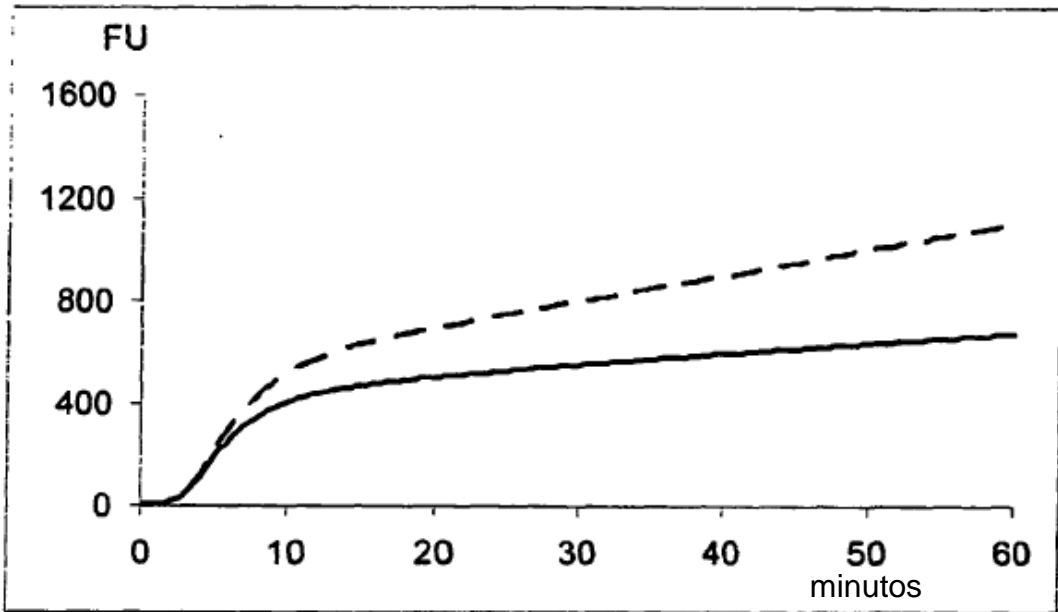


Fig. 8A

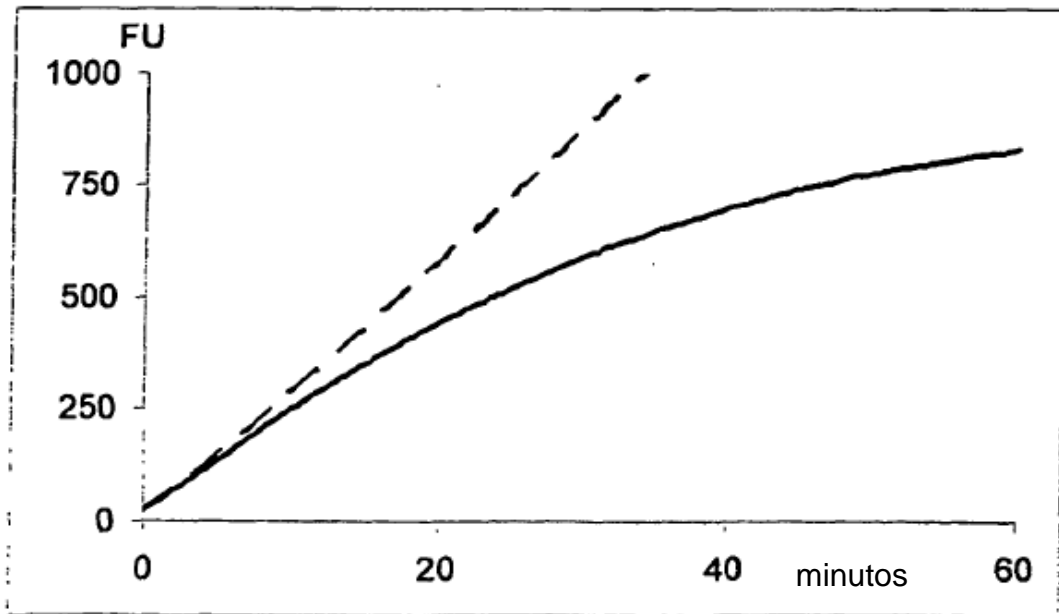


Fig. 8B

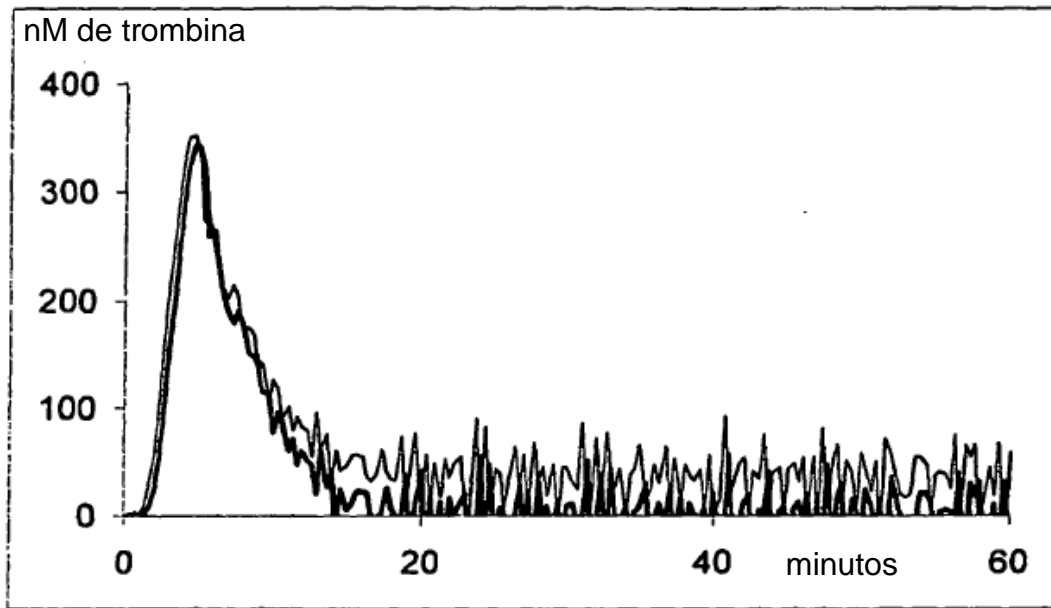


Fig. 9