

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 784**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2010** **E 11008623 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013** **EP 2413143**

54 Título: **Ensayo de coagulación heterogéneo**

30 Prioridad:

09.12.2009 EP 09015240

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2013

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**CHRIST, GERLINDE y
KAPPEL, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 410 784 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

Ensayo de coagulación heterogéneo

La presente invención se encuentra en el campo de la diagnosis de coagulación y hace referencia a métodos para determinar anticoagulantes que inhiben la actividad de factores de coagulación de sangre.

5 En la diagnosis de la coagulación se diferencian los llamados ensayos globales para investigar la funcionalidad de la cascada de coagulación de sangre y los llamados ensayos individuales para determinar la actividad de factores individuales de coagulación de sangre. Tanto para los ensayos globales como también para los ensayos individuales se conocen diferentes formatos de ensayo. Con respecto al formato de ensayo se diferencian esencialmente ensayos de coagulación y ensayos cromogénicos.

10 En el ensayo de coagulación, la muestra del paciente a investigarse que usualmente se componen de plasma se mezcla con un activador de coagulación el cual da inicio al proceso de coagulación. El proceso de la coagulación conduce a la formación de un coágulo de fibrina que puede medirse con ayuda de métodos fotométricos. La velocidad de formación de fibrina es una medida de la funcionalidad de la cascada de coagulación de sangre. Para determinar la actividad de un factor de coagulación individual en un ensayo de coagulación, la muestra de paciente a
15 investigarse se mezcla con un plasma deficiente que proporciona todos los componentes de la cascada de coagulación de sangre, excepto el factor de coagulación de sangre a ensayarse.

En un ensayo cromogénico, la muestra de paciente a investigarse que se compone usualmente de plasma, se mezcla con un activador de coagulación y con un sustrato para un factor de coagulación. Puesto que la mayoría de factores de coagulación son serin-endopeptidasas, es decir hidrolasas que pueden disociar enlaces peptídicos, predominantemente se usan sustratos de péptido que se disocian de modo tan específico como sea posible por el factor de coagulación de sangre a determinarse y que tienen un grupo de señal detectable. De manera más preferida se usan grupos de señal cromogénicos o fluorogénicos disociables que se determinan fotométricamente. En los documentos de las patentes EP 34122 A1 y US 4,508,644 se describe un gran número de sustratos de péptido cromogénicos y su uso en ensayos diagnósticos de coagulación, por ejemplo para determinar los factores de
20 coagulación factor IIa (trombina) y Xa. En el documento EP 78764 A1 se describe un proceso cromogénico para determinar el factor de coagulación XIIa.

En muestras de pacientes también pueden determinarse anticoagulantes que inhiben la actividad de factores de coagulación de sangre, principalmente con ayuda de los ensayos cromogénicos. Para este propósito, la muestra de paciente a examinarse se mezcla con un factor de coagulación activado y con un sustrato para este factor de
30 coagulación. Cuanto más anticoagulante esté contenido en la muestra, más fuerte se inhibe el factor de coagulación activado y menos sustrato se disocia.

Estos métodos conocidos son métodos homogéneos. Los métodos de ensayo homogéneos tienen la ventaja de que la muestra se mezcla con los reactivos de detección para formar una mezcla de ensayo y la reacción de detección se mide en esta mezcla de ensayo sin necesidad de pasos de separación adicionales, por ejemplo, para separar el
35 analito del resto de componentes de muestras. Los métodos de ensayo homogéneos también tienen, sin embargo, la desventaja que se encuentran presentes sustancias intrínsecas a la muestra durante todo el método de ensayo y, como resultado, puede afectar la reacción de detección o puede interferir con la medición de la reacción de detección. Las muestras de paciente pueden contener, por ejemplo en casos individuales, concentraciones anormalmente altas de una o de varias sustancias intrínsecas, es decir endógenas, las cuales demuestran ser interferentes al exceder una concentración tolerable en métodos de detección fotométrica y pueden producir un error sistemático. Se sabe que los problemas son causados por muestras de suero o plasma hemolíticas, ictéricas y/o lipémicas, las llamadas muestras HIL que tienen concentraciones altas anómalas de hemoglobina, bilirrubina y/o triglicéridos. Concentraciones altas anómalas de estas sustancias que interfieren pueden ser causadas por un estado patológico del paciente o sino por obtención o almacenamiento inapropiados de la muestra.

45 La presente solicitud describe un método para determinar la actividad de factores de coagulación proteolíticos en una muestra, el cual resulta menos susceptible de interferencia por parte de una sustancia perjudicial intrínseca a la muestra, y que comprende los siguientes pasos:

a. proporcionar e incubar una mezcla de reacción que contiene

i. la muestra

50 ii. un agente para la activación directa o indirecta del factor de coagulación proteolítico en la muestra,

iii. un sustrato disociable que presenta al menos un sitio de corte para el factor de coagulación activado,

iv. una fase sólida a la cual está enlazada o se enlaza el sustrato disociable durante la incubación;

b. Separar la fase sólida; y

c. Determinar la cantidad de sustrato enlazado a la fase sólida, no disociado.

5 La cantidad de sustrato enlazado a la fase sólida, no disociado, tiene una proporción inversamente proporcional a la actividad del factor de coagulación proteolítico a determinarse.

Proporcionar la mezcla de reacción siempre comprende poner en contacto la muestra, preferentemente una muestra de sangre o de plasma, con un agente para la activación directa o indirecta del factor de coagulación proteolítico a determinar en la muestra y con una fase sólida. El sustrato disociable que tiene al menos un sitio de corte para el factor de coagulación activado puede introducirse a la mezcla de reacción de modos diferentes:

10 - El sustrato disociable, por ejemplo un péptido sintético o una proteína purificada, que no está enlazado a una fase sólida, puede estar contenido en un reactivo separado que se adiciona a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción contiene entonces una fase sólida a la cual se enlaza el sustrato disociable durante la incubación.

15 - El sustrato disociable, por ejemplo un péptido sintético o una proteína purificada, ya está enlazado a la fase sólida y se pone en contacto, junto con la fase sólida como componentes de la misma, con la muestra y el agente para la activación del factor de coagulación proteolítico.

- El sustrato disociable es un sustrato natural, contenido de manera natural en la muestra, para el factor de coagulación activado y de esta manera se introduce a la mezcla de reacción como componente del material de muestra con la muestra. La mezcla de reacción contiene entonces una fase sólida a la cual se enlaza el sustrato disociable natural durante la incubación.

20 Los sustratos disociables que tienen al menos un sitio de corte para un factor de coagulación activado son bastante conocidos para el experto en la materia. Un sustrato disociable puede ser una molécula sintética, producida de modo recombinante o por biotecnología o puede ser una molécula natural que se descompone en dos productos de disociación por acción del factor de coagulación activado. Un sustrato disociable puede componerse total o parcialmente de un péptido. Éste comprende preferiblemente una fracción de péptido al menos en la región del sitio de corte. La fracción de péptido de un sustrato disociable se compone preferiblemente de 3 hasta cerca de 150
25 residuos de aminoácidos.

30 En otra forma de realización, el sustrato disociable puede componerse de una proteína completa o de un fragmento de proteína. Un sustrato disociable también puede ser un sustrato natural de un factor de coagulación activado. Un ejemplo de un sustrato disociable natural es factor V, el cual tiene sitios de corte para proteína activada C, factor Xa, factor IIa (trombina) y plasmina. Otro ejemplo es fibrinógeno que tiene sitios de corte para factor IIa (trombina). Un ejemplo más es factor II (protrombina), que tiene sitios de corte para factor IIa (trombina), factor Xa y diversos venenos de serpientes como, por ejemplo, ecarina o textarina.

En una forma de realización del método, el sustrato disociable, que tiene al menos un sitio de corte para el factor de coagulación, está enlazado a una fase sólida.

35 El término "enlazado" puede entenderse de manera amplia y comprende, por ejemplo, un enlace covalente y uno no covalente, un enlace directo y uno indirecto, la adsorción a una superficie y la inclusión en una cavidad o un espacio hueco, etc. en el caso de un enlace covalente, el sustrato disociable está enlazado mediante un enlace químico a la fase sólida. Ejemplos de un enlace no covalente son la adsorción a una superficie, la inclusión a espacios huecos o el enlace de dos participantes de enlace específicos. Además de un enlace directo a la fase sólida, el sustrato
40 disociable también puede estar enlazado indirectamente a la fase sólida mediante interacción específica con otros participantes de enlace.

En una forma de realización preferida, el sustrato disociable tiene un primer participante de enlace A de un primer par de enlace A/B, y la fase sólida tiene el participante de enlace B, y el sustrato está enlazado mediante enlace del participante de enlace A y B a la fase sólida.

45 En otra forma de realización del método, el sustrato disociable, que tiene al menos un sitio de corte para el factor de coagulación activado, se enlaza a la fase sólida durante la incubación de la mezcla de reacción. Para esto, el sustrato disociable tiene un primer participante de enlace A de un primer par de enlace A/B, y la fase sólida tiene el participante de enlace B, y el sustrato se enlaza durante la incubación de la mezcla de reacción mediante el enlace de los participantes de enlace A y B a la fase sólida.

Los pares de enlace A/B adecuados son, ante todo, combinaciones de antígeno/anticuerpo, en cuyo caso el participante de enlace A es un epítoto antigénico del sustrato disociable. El epítoto antigénico puede ser un epítoto de secuencia o de estructura natural de una proteína natural o de un fragmento de proteína, principalmente cuando en calidad de sustrato disociable se usa un sustrato natural contenido en la muestra. El epítoto antigénico también puede ser un epítoto de secuencia o de estructura heterólogo de un sustrato disociable modificado. Ejemplos de epítotos de secuencia o de estructura heterólogos son FLAG-, o HIS- o fluoresceína-Tags, que se usan principalmente para marcar péptidos o proteínas. El participante de enlace B enlazado a la fase sólida puede seleccionarse de tal modo que el sustrato disociable puede enlazarse de modo específico. El participante de enlace B se compone preferentemente de un anticuerpo o de un fragmento del mismo que forma un antígeno. Pares de enlace A/B particularmente preferidos son FLAG-Tag/anti-FLAG-Tag-anticuerpo, HIS-Tag/anti-HIS-Tag-anticuerpo y fluoresceína/anti-fluoresceína-anticuerpo.

En otra forma de realización del método, el sustrato disociable tiene un primer participante de enlace X de un segundo par de enlace X/Y, el cual interactúa con el segundo participante de enlace Y del segundo par de enlace X/Y y en tal caso el segundo participante de enlace Y se asocia con un componente de un sistema formador de señal. De esta manera el sustrato no disociado puede detectarse. El participante de enlace X está dispuesto en una región del sustrato que está separada de la región del sustrato que está enlazada a la fase sólida, siempre que el sustrato está disociado por el factor de coagulación proteolítico activado.

Pares de enlace adecuados X/Y son, por ejemplo, combinaciones antígeno/anticuerpo, en cuyo caso el participante de enlace X es un epítoto antigénico del sustrato disociable. El epítoto antigénico puede ser un epítoto de secuencia o de estructura natural de una proteína natural o de fragmento de proteína, principalmente cuando como sustrato disociable se usa un sustrato natural contenido en la muestra. El epítoto antigénico también puede ser un epítoto de secuencia o de estructura heterólogo de un sustrato disociable modificado. Ejemplos de epítotos de secuencia o de estructura heterólogos son FLAG o HIS o fluoresceína-tags (etiquetas), que se usan principalmente para la marcación de péptidos o de proteínas. Otros pares de enlace adecuados X/Y son por ejemplo biotina/avidina y biotina/estreptavidina.

El segundo participante de enlace Y está asociado con un componente de un sistema formador de señal.

Un "sistema formador de señal" puede ser uno o varios componentes, en cuyo caso el componente es una etiqueta detectable. Una etiqueta puede entenderse como cualquier molécula que produce por sí misma una señal o que puede inducir la producción de una señal tal como, por ejemplo, una sustancia fluorescente. Una sustancia radioactiva, una enzima o una sustancia quimioluminiscente. La señal puede detectarse o medirse, por ejemplo, mediante la actividad enzimática, de la luminiscencia, de la absorción de luz, de la dispersión de luz, de la radiación electromagnética emitida o radioactiva o de una reacción química

Una etiqueta es capaz por sí misma de generar una señal detectable de modo que se necesitan otros componentes. Muchas moléculas orgánicas absorben luz ultravioleta y visible, por lo cual estas moléculas pueden llegar a un estado de energía excitado y la energía absorbida es emitida en forma de luz de otra longitud de onda que la luz de excitación. Otras etiquetas como, por ejemplo, isótopos radioactivos o colorantes pueden generar directamente una señal detectable.

Para la generación de señal, otras etiquetas necesitan otros componentes, es decir el sistema productor de señal incluye en un caso tal todos los componentes necesarios para la formación de señal como, por ejemplo, sustratos, coenzimas, *quencher* (sofocadores), acelerantes, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos de enzima, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, iones, etc.

Etiquetas adecuadas son, por ejemplo, enzimas, incluidas peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfatodehidrogenasa, alcoholdehidrogenasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, luciferasa, ureasa y acetilcolinesterasa; colorantes; sustancias fluorescentes, incluido fluorescein isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, etidibromuro, 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilcloruro y quelatos fluorescentes de tierras raras; sustancias quimioluminiscentes incluidos luminol, isoluminol, compuestos de acridinio, olefina, éteres enólicos, enamina, éteres de arilvinilo, dioxeno, arilimidazol, lucigenina, luciferina y aequorina; *sensitizer* (sensibilizador) incluyendo eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, porfirino, ftalocianina, clorofila, rose bengal; coenzimas; sustratos de enzima; isótopos radioactivos que incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{57}Co y ^{75}Se .

La fase sólida a la que está enlazado el sustrato disociable o a la que se enlaza durante la incubación, contiene un objeto que se compone de material poroso y/o no poroso, por lo regular hidrófilo y puede tener las formas más diversas como, por ejemplo, formas de recipientes, tubos, placas de microtitulación, esferas, micropartículas, barritas, tiras, papel filtro o de cromatografía. Por lo regular la superficie de la fase sólida es hidrófila o puede hacerse hidrófila. La fase sólida puede componerse de los materiales más diversos como, por ejemplo, de materiales inorgánicos y/u orgánicos, hechos de materiales sintéticos, de procedencia natural y/o de procedencia natural modificada. Ejemplos de materiales de fase sólida son polímeros como, por ejemplo, celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, polivinilcloruro, poliacrilamida, moléculas de dextrano reticulado, agarosa, poliestireno,

polietileno, polipropileno, polimetacrilato o nailon; cerámica, vidrio, metales, principalmente metales nobles como oro y plata; magnetita; mezclas o combinaciones de los mismos; etc.

5 La fase sólida puede tener un recubrimiento de una o varias capas, por ejemplo de proteínas, carbohidratos, sustancias lipofílicas, biopolímeros, polímeros orgánicos o mezclas de los mismos, con el fin de suprimir o de impedir, por ejemplo, el enlace no específico de componentes de la muestra a la fase sólida o con el fin de lograr mejoramientos, por ejemplo, respecto de la estabilidad en suspensión de fases sólidas en forma de partículas, de la estabilidad en el almacenamiento, de la estabilidad dimensional o de la resistencia frente a la luz-UV, microbios u otros agentes con efecto destructor.

10 Para la activación directa o indirecta del factor de coagulación proteolítico en la muestra, usualmente se mezcla la muestra con un agente que produce una activación directa o indirecta del factor de coagulación proteolítico. Por activación directa se entiende que se usa un agente que activa directamente el factor de coagulación proteolítico a determinarse, independientemente de la presencia de otros factores de coagulación. Por activación indirecta se entiende que se usa un agente que activa uno o más factores de coagulación de sangre de la cascada de coagulación de sangre, los cuales activan a su vez el factor de coagulación proteolítico a investigarse. El tipo del agente depende de cuál factor de coagulación debe determinarse, si la actividad del factor de coagulación debe determinarse solo o si debe determinarse la funcionalidad de la cascada de coagulación de sangre o de una región parcial de la cascada de coagulación de sangre (vía extrínseca o intrínseca) mediante un factor de coagulación. Las sustancias y las mezclas específicas de diferentes sustancias que posibilitan una activación directa o indirecta de factores de coagulación proteolíticos son bastante conocidos para el experto en la materia y comprenden, por ejemplo, fosfolípidos tales como, por ejemplo, fosfolípidos cargados negativamente; lipoproteínas como, por ejemplo, tromboplastina; proteínas como, por ejemplo, factor de tejido, serinproteasas activadas como, por ejemplo, factor IIa (trombina), factor VIIa, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa o proteína activada C; venenos de serpientes como, por ejemplo enzima PROTAC®, ecarina, textarina, noscarina, batroxobina, trombocitina o *Russell's Viper Venom* (RVV); activadores de contacto como, por ejemplo, sílice, caolín, ácido elágico o celita. Otras sustancias que un agente puede contener son, por ejemplo, sustancias amortiguadoras de pH, sales, detergentes, iones, principalmente iones de calcio y formadores de quelato.

Por una "muestra" en el sentido de la invención se entiende el material que supuestamente contiene el factor de coagulación proteolítico a detectar. El término muestra comprende principalmente fluidos corporales de humanos o animales, particularmente sangre y plasma.

30 Después de que se ha preparado la mezcla de reacción que contiene la muestra, un agente para la activación del factor de coagulación proteolítico, un sustrato disociable y una fase sólida a la que está enlazado o se enlaza el sustrato disociable, la mezcla de reacción se incuba por un tiempo limitado con el fin de garantizar una activación suficiente del factor de coagulación, una disociación suficiente de sustrato por parte del factor de coagulación activado y opcionalmente un enlace suficiente del sustrato disociable y del producto de disociación del sustrato a la fase sólida. Por el término "suficiente" se entiende que el método hace posible en conjunto una determinación cuantitativa de la actividad del factor de coagulación. La duración óptima de incubación de un determinado montaje de ensayo puede averiguarse experimentalmente.

40 En una forma de realización preferida, a la mezcla de reacción puede adicionarse un inhibidor de la agregación de fibrina. Por un inhibidor de agregación de fibrina se entiende una sustancia, principalmente un oligopéptido sintético que inhibe la adición entre sí (polimerización) de los monómeros de fibrina, los cuales surgen por la acción de trombina y con esto se impide una formación de coágulo en la mezcla de reacción (véase, por ejemplo EP 0 456 152 B1).

45 Después de que se incubó la mezcla de reacción se separa la fase sólida, y con esta los componentes enlazados a la misma, de los demás componentes de la mezcla de reacción. La separación puede efectuarse de diferente manera según el tipo de la fase sólida, por ejemplo mediante centrifugación, filtración, separación magnética o mediante succión de la fase líquida de la mezcla de reacción. Después de la separación de la fase sólida puede realizarse al menos un paso de lavado con el fin de retirar los residuos de la mezcla de reacción de la manera más completa posible de la fase sólida y/o para preparar la reacción de detección subsiguiente. Para esto se incuba la fase sólida con una solución de lavado, preferentemente con una solución de amortiguador de pH, y a continuación se separa de nuevo con la solución de lavado.

55 La determinación de la cantidad de sustrato no disociado, enlazado con la fase sólida puede efectuarse de diferente manera según el tipo del sistema de detección usado, por ejemplo mediante incubación de la fase sólida con un reactivo que contiene sustancias que interactúan de modo específico con el sustrato no disociado y generan una señal medible. La determinación de la cantidad de sustrato no disociado, enlazado con la fase sólida se efectúa preferentemente incubando la fase sólida con un reactivo de detección que contiene el participante de enlace Y del segundo par de enlace X/Y, el cual se enlaza de modo específico al participante de enlace X del sustrato no disociado. El participante de enlace Y puede estar asociado directamente con un componente señalizador o asociarse con un componente señalizador.

La cantidad o intensidad de la señal tiene una relación proporcional con la cantidad de sustrato no disociado, enlazado con la fase sólida y con esto inversamente proporcional a la actividad del factor de coagulación proteolítico.

El método para determinar un factor de coagulación proteolítico es adecuado principalmente para determinar los factores de coagulación proteolíticas factor II, factor VII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII o proteína C.

- 5 El objeto fundamental de la presente invención consiste en proporcionar un método para la determinación cuantitativa de un anticoagulante en una muestra, que sea menos susceptible de interferencia por parte de sustancias perjudiciales intrínsecas a la muestra.

Este objeto se logra, según la invención, por el hecho de que el método comprende los siguientes pasos:

a. proporcionar e incubar una mezcla de reacción que contiene:

- 10 i. la muestra,

ii. una cantidad definida de un factor de coagulación activado, cuya actividad puede ser influida directa o indirectamente por el anticoagulante a determinar, y en donde el factor de coagulación activado está contenido en un reactivo separado, el cual se adiciona a la mezcla de reacción,

iii. un sustrato disociable que tiene al menos un sitio de corte para el factor de coagulación activado,

- 15 iv. una fase sólida a la que el sustrato disociable está enlazado o se enlaza durante la incubación;

b. Separar la fase sólida; y

c. Determinar la cantidad de sustrato no disociado, enlazado a la fase sólida.

En dicho método se adiciona una cantidad definida conocida de un factor de coagulación activado a la mezcla de reacción. El factor de coagulación activado que se debe adicionar depende del anticoagulante que se determine.

- 20 Para la determinación de una heparina, es decir, de una heparina de alto peso molecular sin fraccionar (heparina HMW) o de una heparina de bajo peso molecular (heparina LMW) o de un heparinoide, resulta particularmente apropiada la adición de factor IIa (trombina) o de factor Xa. Para la determinación de un inhibidor de trombina directo, por ejemplo, argatrobán, melagatrán, ximelagatrán, bivalirudina, dabigatrán o hirudina, resulta particularmente apropiada la adición de factor IIa (trombina). Para la determinación de un inhibidor directo del factor Xa, por ejemplo, rivaroxabán, resulta particularmente apropiada la adición de factor Xa.

25 Cuanto más anticoagulante esté contenido en la muestra, más fuerte se inhibe el factor de coagulación activado adicionado, y menos sustrato se disocia. Por consiguiente, la cantidad de sustrato enlazado a la fase sólida, no disociado, presenta un comportamiento proporcional a la cantidad contenida en la muestra, o a la actividad del anticoagulante a determinar.

- 30 Además, en el método conforme a la presente invención, para la determinación cuantitativa de un anticoagulante:

- una cantidad definida de un factor de coagulación activado, cuya actividad puede ser influida directa o indirectamente por el anticoagulante a determinar, y en donde el factor de coagulación activado está contenido en un reactivo separado, el cual se adiciona a la mezcla de reacción, y

- 35 - dado que la mezcla de reacción no debe contener ningún agente para la activación de un factor de coagulación proteolítico, las explicaciones anteriormente mencionadas para la ejecución del método para la determinación de un factor de coagulación proteolítico, también se puede aplicar en el método conforme a la presente invención, para la determinación cuantitativa de un anticoagulante.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben entenderse como una restricción.

Descripción de figuras

- 40 Figura 1

La figura 1 muestra los valores de extinción a 450 nm de muestras en las que la vía extrínseca de la coagulación fue activada por Innovin® (un reactivo de tromboplastina) y en las que fue determinada la actividad de trombina (véase ejemplo 1). Las muestras son un Standard Human Plasma (SHP), el cual contiene en todo su alcance todos los

factores de coagulación, así como plasmas con deficiencia de factores de la vía extrínseca (F II, F V, F VII, F X) y de la vía intrínseca (F VIII, F IX, F XI). Dependiendo de la cantidad de trombina en la muestra activada que, a su vez, depende de la presencia de los factores de la vía de coagulación extrínseca, se disocia el sustrato de péptido sensible a trombina. Cuanta más trombina está contenida en la muestra tanto más sustrato de trombina se disocia y tanto menos sustrato de trombina no disociado puede detectarse. Los valores de extinción medidos son, de esta manera, inversamente proporcional a la actividad de trombina en la muestra y a la actividad de la cascada de coagulación extrínseca. Por lo tanto, en el experimento mostrado todos los plasmas con deficiencia de factores de la vía extrínseca (principalmente el plasma de deficiencia FII) valores de extinción superiores que el plasma normal (SHP); por lo contrario, los plasmas con factores no involucrados en la vía de coagulación extrínseca (factor VIII, IX, XI) no tienen diferencias de señal con SHP. Por lo tanto, con el ensayo mostrado pudo detectarse unívocamente una deficiencia de factores de la vía de coagulación extrínseca en plasmas.

Figura 2

La figura 2 muestra los valores de extinción a 450 nm de muestras con diferente concentración de Refludan® a las cuales se adicionó una cantidad definida de trombina (Thr. 1 IU/ml, Thr. 10 IU/ml) y en las cuales se determinó la actividad de trombina (véase el ejemplo 2). Cuanto más esté contenido el inhibidor directo de trombina Refludan® en una muestra, tanto más se inhibe la trombina adicionada, tanto menos se disocia el sustrato de trombina y tanto mayor sustrato de trombina no disociado puede detectarse. Los valores de extinción medidos son de esta manera proporcionales a la actividad inhibidora de trombina Refludan® en la muestra. En tal caso fue ostensible que la sensibilidad del método para muestras con concentraciones terapéuticamente bajas de Refludan® (hasta 1 µg/ml) al adicionar una cantidad de trombina comparativamente baja (1 IU/ml) es particularmente buena, mientras que la sensibilidad del método para las muestras con concentraciones terapéuticamente altas de Refludan® (1-5 µg/ml) al adicionar una cantidad comparativamente alta de trombina (10 IU/ml) es particularmente buena.

Ejemplos

Ejemplo 1: Método para determinar la actividad de trombina

Primero se recubrieron placas e microtitulación (Nunc-ThermoFisher, Roskilde, Dinamarca) con un anticuerpo monoclonal FLAG-específico de epítipo (MAK M2, Sigma Aldrich, Múnich, Alemania). A continuación se incubó un sustrato de péptido específico de trombina que comprende siete residuos de aminoácidos, con los residuos de aminoácidos leucina, valina, prolina, arginina, glicina, fenilalanina, glicina en la secuencia mencionada, el cual tiene en el extremo aminoterminal un epítipo FLAG-Tag y se encuentra biotinilado en el extremo carboxiterminal, con el anti-FLAG-anticuerpo enlazado a la fase sólida y de esta manera enlazado a la fase sólida. Se adicionaron los siguientes reactivos en la siguiente secuencia por cavidad:

25 µl de una solución de inhibidor de agregación de fibrina (6 mg/ml de un oligopéptido sintético con los restos de aminoácidos glicina, prolina, arginina, prolina, alanina en la secuencia mencionada); 25 µl de muestra; y

25 µl de Innovin® (*Tissue Factor* recombinante humano con fosfolípidos sintéticos, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania) como activador de coagulación.

Como muestras se emplearon Standard Human Plasma (SHP) y plasmas deficientes de factor de coagulación (factor II, factor X, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI).

La mezcla de reacción se entremezcló y se incubó por 15 minutos a 37 °C. Luego se succionó la mezcla de reacción y cada cavidad se lavó tres veces respectivamente con 250 µl de búfer de lavado. Para detectar sustrato de trombina no disociado, enlazado a la fase sólida en cada cavidad se adicionaron 100 µl de una solución de conjugado estreptavidina/peroxidasa (POD) (0,33 µg/ml, Sigma Aldrich) y a su vez se incubó por 30 minutos a 20-25 °C. Luego se succionó la solución de conjugado y cada cavidad se lavó tres veces respectivamente con 250 µl de búfer de lavado. A continuación en cada cavidad se adicionaron 100 µl de una solución de búfer con 0,5 g/L de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-dihidrocloruro) y 0,1 g/L de peróxido de hidrógeno y se incubó a su vez por 30 minutos a 20-25 °C. Para detener la reacción de peroxidasa a cada cavidad 100 µl de ácido sulfúrico de 0,5 N, y se determinó la extinción a 450 nm respecto de la longitud de onda de referencia 650 nm por medio de un fotómetro MTP Sunrise® (Tecan Trading AG, Suiza).

Los resultados se representan en la figura 1.

Ejemplo 2: Método para la determinación cuantitativa del inhibidor de trombina directo Refludan®

ES 2 410 784 T3

Tal como se describe en el ejemplo 1, un sustrato de péptido específico de trombina que comprende siete residuos de aminoácidos, el cual tiene un epítipo de FLAG-Tag y está biotinilado en el extremo aminoterminal, está enlazado a la fase sólida (placa de microtitulación) a través de un anti-FLAG-anticuerpo.

Por cavidad se adicionaron los siguientes reactivos en la siguiente secuencia:

- 5 50 µl de una solución de inhibidor de agregación de fibrina (3 mg/ml de un oligopéptido sintético con los residuos de aminoácidos glicina, prolina, arginina, prolina, alanina en la secuencia mencionada);
25 µl de muestra; y
25 µl de solución de α-trombina bovina (4 o 40 IU de α-trombina bovina/ml, 10 KIE/ml de aprotinina, 150 mM/L de NaCl, 5 mg/ml de albúmina de suero bovino, 10 mg/ml de manitol, 5 µg/ml de hexadimetribromuro).
- 10 Mediante las diferentes concentraciones de trombina puede garantizarse la sensibilidad en los diferentes campos terapéuticos.

Como muestras se usan Standard Human Plasma (SHP) y muestras de plasma citrato normal humano. Estas se hicieron alícuotas y se adicionaron a las alícuotas respectivamente 0,0 µg/ml, 0,2 µg/ml, 1,0 µg/ml y 5 µg/ml de Recludan® (Ilepirudina, hirudina recombinante, CSL Behring GmbH, Marburg, Alemania).
- 15 La detección de sustrato de trombina no disociado, enlazado a la fase sólida, se realizó tal como se describe en el ejemplo 1, y se determinó la extinción a 450 nm respecto de la longitud de onda de referencia de 650 nm por medio de un fotómetro MTP Sunrise® (Tecan Trading AG, Suiza).

Los resultados se representan en la figura 2.

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación cuantitativa de un anticoagulante en una muestra, en donde el método comprende los siguientes pasos:
- a. proporcionar e incubar una mezcla de reacción que contiene
 - 5 i. la muestra,
 - ii. una cantidad definida de un factor de coagulación activado, cuya actividad puede ser influida directa o indirectamente por el anticoagulante a determinar, y en donde el factor de coagulación activado está contenido en un reactivo separado, el cual se adiciona a la mezcla de reacción,
 - 10 iii. un sustrato disociable que tiene al menos un sitio de corte para el factor de coagulación activado,
 - iv. una fase sólida a la que el sustrato disociable está enlazado o se enlaza durante la incubación;
 - b. Separar la fase sólida; y
 - c. Determinar la cantidad de sustrato no disociado, enlazado a la fase sólida.
2. Método según la reivindicación 1, para la determinación cuantitativa de un anticoagulante del grupo heparina LMW, heparina HMW, heparinoide, inhibidores de trombina directos, e inhibidores directos del factor Xa.
3. Método según la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción contiene una cantidad definida de un factor de coagulación activado del grupo factor IIa y factor Xa.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato disociable está contenido en un reactivo separado que se adiciona a la mezcla de reacción y en el que la mezcla de reacción contiene una fase sólida a la que el sustrato disociable se enlaza durante la incubación.
5. Método según la reivindicación 4 en el que el sustrato disociable comprende un péptido que se compone de 3 a 150 residuos de aminoácidos.
6. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato disociable es un sustrato natural para el factor de coagulación activado y un componente de la muestra y en el que la mezcla de reacción contiene una fase sólida a la que el sustrato disociable se enlaza durante la incubación.
7. Método según la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción contiene una fase sólida a la que el sustrato disociable está enlazado de modo covalente.
8. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato disociable tiene un primer participante de enlace A de un primer par de enlace A/B y en el que la fase sólida tiene el segundo participante de enlace B del primer par de enlace A/B y en el que el sustrato disociable está enlazado mediante un enlace de los participantes del enlace A y B a la fase sólida o se enlaza durante la incubación.
9. Método según la reivindicación 8, en el que los participantes de enlace A y B se seleccionan de tal modo que forman un par de enlace A/B del grupo FLAG-Tag/anti-FLAG-Tag-anticuerpo, HIS-Tag/anti-HIS-Tag-anticuerpo fluoresceína/anti-fluoresceína-anticuerpo.
10. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato disociable tiene un primer participante de enlace X de un segundo par de enlace X/Y y en el que el segundo participante de enlace Y del segundo par de enlace X/Y está asociado con un componente de un sistema generador de señal.
11. Método según la reivindicación 10 en el que los participantes de enlace X e Y se seleccionan de tal modo que forman un par de enlace X/Y del grupo de biotina/avidina, biotina/estreptavidina.
12. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el cual se adiciona además un inhibidor de la agregación de fibrina a la mezcla de reacción.

FIG 1

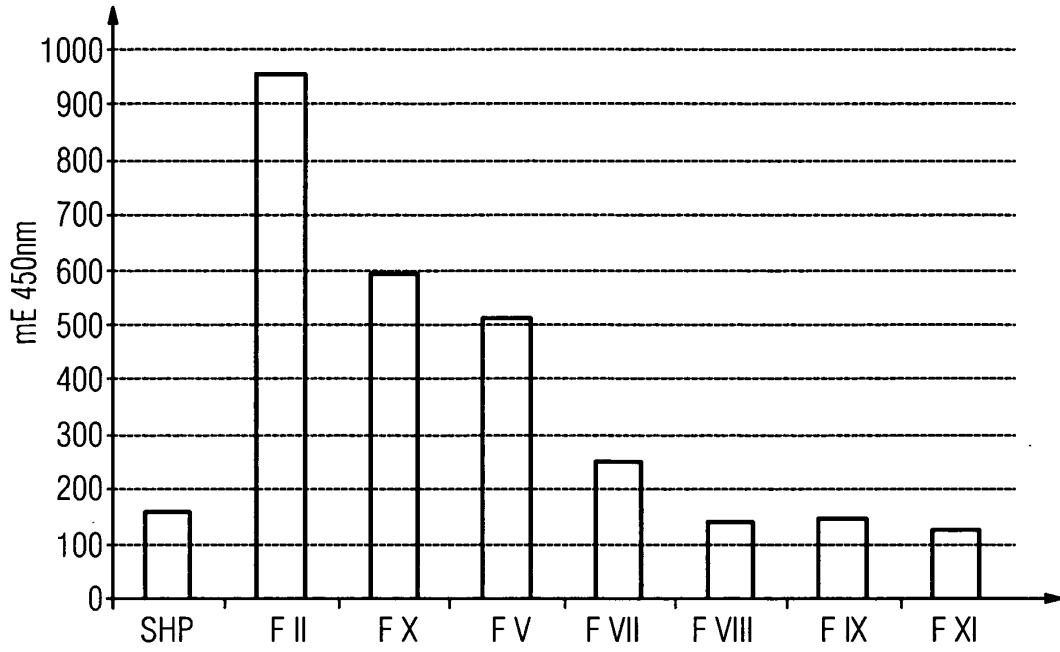


FIG 2

