

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 662**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008** **E 08020688 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013** **EP 2072624**

54 Título: **Reactivo a base de tromboplastina estable a largo plazo**

30 Prioridad:

21.12.2007 DE 102007062323

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.07.2013

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
GÖRZHÄUSER HOF, EMIL-VON-BEHRING-
STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

RECHNER, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 415 662 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

Reactivo a base de tromboplastina estable a largo plazo

La presente invención corresponde al área de diagnóstico de coagulación y hace referencia a un reactivo en base al factor tisular recombinante o nativo y a fosfolípidos, el cual puede ser estabilizado a través de la adición de un polifenol.

El factor tisular (tromboplastina, "tissue factor" en inglés) es una proteína transmembranal de gran importancia para la coagulación de la sangre. Se expresa por células que por lo general no se encuentran en contacto con sangre circulante, como por ejemplo células en el subendotelio (musculatura lisa) y células que rodean los vasos sanguíneos (por ejemplo fibroblastos). No obstante, en el caso de un daño en el vaso sanguíneo, las células que expresan el factor tisular, entran en contacto con el factor VII, un factor precoagulatorio para la coagulación de la sangre que circula en la sangre. En presencia de calcio, el factor tisular y el factor VII forman un complejo, y la actividad del factor VII aumenta mil veces ($F VII > F VIIa$). El complejo del factor tisular y el factor VIIa, en presencia de fosfolípidos, cataliza la conversión del factor de coagulación inactivo, el factor X, en un factor Xa activado, acelerando así el proceso de coagulación. Junto con el factor VII, el factor tisular forma la así llamada vía extrínseca de la coagulación de la sangre, a través de la cual debe impedirse una lesión de los vasos sanguíneos mediante una coagulación de la sangre lo más rápida posible.

En el diagnóstico de coagulación fueron desarrollados diferentes procedimientos in vitro mediante cuya ayuda puede determinarse si la sangre o el plasma de un paciente puede coagular de forma correcta, o si existe alguna coagulopatía. En el caso de una coagulopatía, con frecuencia es necesario obtener información más precisa sobre la causa de la afección existente para poder escoger las medidas terapéuticas óptimas. El factor tisular se utiliza para examinar diferentes subfunciones de la coagulación de la sangre, en particular para examinar el sistema extrínseco de la coagulación de la sangre. La aplicación más conocida del factor tisular como activador de coagulación es la así llamada prueba rápida (quick test, en inglés) para determinar el tiempo de protrombina (PT) (sinónimo: tiempo de tromboplastina). En la prueba rápida y sus variantes, por lo general, una muestra de plasma se mezcla con factor tisular, fosfolípidos e iones de calcio, y se mide en segundos el tiempo desde el momento del mezclado hasta la formación de fibrina tangible. En las pruebas de coagulación donde se utilizan sustratos cromógenos, de forma alternativa, se mide el tiempo desde el momento del mezclado hasta alcanzar una variación de absorción determinada. El factor tisular se emplea también en otros procedimientos de prueba que no se utilizan para determinar el tiempo de coagulación, sino para determinar componentes individuales del sistema de coagulación, como por ejemplo el potencial de trombina endógena (ETP, por sus siglas en inglés) (EP 420 332 A2). En principio, el factor tisular puede utilizarse en todas las pruebas vinculadas a la coagulación extrínseca.

El reactivo de tromboplastina (reactivo de factor tisular) tiene una importancia central para la respectiva prueba. Generalmente, un reactivo de tromboplastina contiene el factor tisular junto con fosfolípidos activos para la coagulación. El factor tisular se obtiene como extracto tisular de diferentes órganos (por ejemplo del cerebro, la placenta, el pulmón) de especies diferentes (por ejemplo conejos, seres humanos, bovinos), o se produce de forma recombinante. En el estado de arte se conocen numerosos métodos para obtener factor tisular y para producir reactivos de tromboplastina, y una gran cantidad de reactivos de tromboplastina puede obtenerse a través del comercio.

En la solicitud US 4 416 812 se describe un reactivo correspondiente.

Actualmente, la mayoría de los reactivos de tromboplastina que pueden obtenerse a través del comercio son tratados de forma liofilizada y por lo tanto, antes de ser utilizados, deben ser disueltos en un medio de reconstitución, por ejemplo en agua destilada o en una solución tampón. Este proceso se realiza debido a la escasa estabilidad de los reactivos en estado líquido. La desventaja de los reactivos que se proporcionan de forma liofilizada reside no sólo en el hecho de que el fabricante y el usuario deben ejecutar pasos del procedimiento adicionales, para los cuales se invierte mucho tiempo y dinero (liofilización y reconstitución), sino también en que estas medidas adicionales implican el riesgo de que se produzcan errores que pueden perjudicar la calidad del reactivo. Se consideran preferentes, por tanto, las fórmulas de reactivos líquidas, listas para ser utilizadas. Pero al suministrarse reactivos de tromboplastina líquidos se presenta el problema de su escasa estabilidad. Como la estabilidad del reactivo de tromboplastina, a modo de ejemplo, puede entenderse la constante temporal del tiempo de protrombina para un plasma definido, por ejemplo un plasma normal. De forma ideal, un reactivo de tromboplastina debería mantener sus especificaciones durante el tiempo de su almacenamiento o de su uso, o en el mejor de los casos tales propiedades y características como en el momento de su producción.

En el estado del arte se describen diferentes estrategias para estabilizar reactivos de tromboplastina líquidos. En la solicitud EP 942 284 A2 se describe un reactivo de tromboplastina en base a factor tisular recombinante que es estabilizado a través de la adición combinada de ácido ascórbico y una albúmina sérica. En la solicitud US 3,522,148 se describe un reactivo líquido de tromboplastina en base a factor tisular (natural) extraído de un tejido, el cual es estabilizado a través de la adición de determinadas sales de calcio o de sodio. En la solicitud EP 585 987 A1 se

describe otro reactivo líquido de tromboplastina en base a factor tisular natural que es estabilizado a través de la adición de diferentes estabilizadores, como albúmina o polietilenglicol, así como diferentes sustancias con actividad antimicrobiana, como azida de sodio o antibióticos.

5 Es objeto de la presente invención el proporcionar un método alternativo para estabilizar un reactivo de tromboplastina líquido. Este objeto se alcanzará a través del método y de los objetos descritos en las reivindicaciones, conforme a la invención. En particular, este objeto se alcanzará a través de un reactivo de tromboplastina que contiene un factor tisular y fosfolípidos, al cual se le añade al menos un polifenol soluble en agua que presenta al menos una función catecol.

10 Los polifenoles son compuestos aromáticos que contienen en la molécula dos o más grupos hidroxilo fenólicos (véase también Macheix, Jean-Jaques y otros: Fruit Phenolics. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1990, capítulo 1). Los polifenoles naturales se encuentran presentes en las plantas como colorantes (antocianina), aromatizantes y ácidos tánicos (taninos). Actualmente se conocen más de 8000 de estas sustancias vegetales, en su mayoría bioactivas, denominadas sustancias vegetales secundarias. Sus funciones en el reino vegetal abarcan desde la protección contra comedores de plantas y el ataque ocasionado por bacterias u hongos, hasta la atracción de insectos para polinizar a través de sus colores (por ejemplo en las flores).

15 Como "función catecol" debe entenderse la presencia de dos grupos orto - hidroxilo en un anillo aromático del polifenol, es decir, la presencia de, respectivamente, un grupo hidroxilo en dos átomos de carbono directamente contiguos de un anillo aromático (por ejemplo en posición 1,2; posición 2,3; posición 3,4; etc., como por ejemplo en el ácido 3,4 dihidroxibenzoico).

20 Dentro del marco de la presente invención, se consideran como polifenoles adecuados aquellos que al menos presentan una función catecol. Éstos pueden presentar más de una función catecol, donde las funciones catecol pueden estar presentes tanto en el mismo anillo aromático, como también en diferentes anillos aromáticos del polifenol. Por ejemplo, dos funciones catecol pueden existir debido a que un anillo aromático de los grupos orto - hidroxilos (por ejemplo en la posición 3, 4, 5; como por ejemplo galocatequina), o dos anillos aromáticos del compuesto presentan, respectivamente, una función catecol (como por ejemplo el ácido rosmarínico). Por ejemplo, tres funciones catecol pueden encontrarse presentes debido a que un primer anillo aromático presenta tres grupos orto - hidroxilos y un segundo anillo aromático dos grupos orto - hidroxilos (como por ejemplo el galato de catequina), o debido a que tres anillos aromáticos del compuesto presentan respectivamente una función catecol (como por ejemplo procianidina - trómero de tres moléculas de catequina). Lo mismo se puede aplicar para los polifenoles que presentan más de tres funciones catecol. El galato de epigalocatequina, por ejemplo, dispone de cuatro funciones catecol, debido a que dos anillos aromáticos presentan respectivamente tres grupos orto - hidroxilos.

35 Los flavonoides y los ácidos fenólicos forman los dos subgrupos más importantes de los polifenoles. De manera adicional, entre los polifenoles figuran además los grupos de sustancias de estilbeno, cumarina, xantona, lignina y tanino. Los flavonoides son un grupo de pigmentos vegetales solubles en agua que están contruidos químicamente todos basados en la estructura fundamental del flavano (véase también Macheix, Jean-Jaques y otros: Fruit Phenolics. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1990, capítulo 1). La mayoría de los flavonoides se encuentran ligados a glucosa o ramnosa, por lo que se los denomina también glicósidos. Sólo los flavan-3-oles y la proantocianidina no se encuentran ligados a moléculas de azúcar (= aglicona).

40 De acuerdo con las propiedades estructurales, los flavonoides se clasifican en:

- flavonoles (por ejemplo quercetina, rutina, caempferol, miricetina y sus derivados).

- flavan-3-oles (por ejemplo catequina, galocatequina, epicatequina, galato de epigalocatequina),

- procianidina (polímero flavan-3-ol),

- flavonas (por ejemplo luteolina, apigenina, morina y sus derivados),

45 - flavanonas (por ejemplo hesperetina, naringenina, eriodictiol y sus derivados, por ejemplo hesperidina o naringina),

- isoflavonas (por ejemplo genisteína, daidzeína y sus derivados),

- antocinina (por ejemplo cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina y sus derivados).

50 Se ha descrito que los flavan-3-oles gálicos, como el galato de epigalocatequina, in vitro actúan de forma inhibidora con respecto a la generación de trombina [Stampfuss y otros (2005) Green tea catechins containing a galloyl group in the 3' position inhibit tissue factor induced thrombin generation. Thromb Haemost 93: 1200-1201].

Los ácidos fenólicos son compuestos químicos que se dividen en los grupos de los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos (véase también Macheix, Jean-Jaques y otros: Fruit Phenolics. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, 1990, capítulo 1). Entre los ácidos hidroxibenzoicos figuran, entre otros, el ácido salicílico, el ácido gálico, el ácido protocatéuico y el ácido vainillínico, así como sus derivados, como por ejemplo el ácido 3,4 dihidroxibenzoico. Entre los ácidos hidroxicinámicos más conocidos se encuentran, por ejemplo, el ácido cafeico, el ácido ferúlico, el ácido sinapínico y el ácido coumárico, así como sus derivados, como por ejemplo la cafeoilglucosa, el ácido rosmarínico, el ácido feruloilquinico. En la naturaleza, los ácidos fenólicos se presentan de forma similar a los flavonoides, casi exclusivamente en forma ligada. Frecuentemente, son ésteres con ácidos orgánicos o glicósidos, como por ejemplo, el ácido clorogénico y ácido caftárico.

Es objeto de la presente invención un procedimiento para estabilizar reactivos de tromboplastina, es decir de soluciones acuosas que contengan el factor tisular, así como fosfolípidos. Se ha demostrado que la adición de uno o varios polifenoles, donde al menos un polifenol es soluble en agua y presenta al menos una función catecol, incrementa la estabilidad de una solución acuosa que contiene factor tisular y fosfolípidos. Los reactivos de tromboplastina estabilizados conforme a la invención, aun después de un almacenamiento de 12 meses a +2 °C hasta +8 °C, arrojan resultados de medición del tiempo de protrombina (PT) que difieren en menos de un 25 % del resultado de medición del PT al inicio del tiempo de ejecución. Un almacenamiento forzado a +37 °C durante 8 semanas permite estimar rápidamente si puede esperarse una estabilidad de almacenamiento a +2 °C hasta +8 °C por un período de 12 meses o más. Si un reactivo de tromboplastina estabilizado, en el caso de un almacenamiento a +37 °C durante un período de 4 semanas, arroja resultados de medición del tiempo de protrombina (PT) que difieren en menos del 25 % del resultado de medición del PT al inicio del tiempo de ejecución, puede entonces esperarse que el reactivo, a una temperatura de almacenamiento de +2 °C hasta +8 °C se mantenga estable durante un período de 12 meses o más.

En el procedimiento conforme a la invención, al reactivo de tromboplastina se le añade al menos un polifenol soluble en agua que presenta al menos una función catecol, de manera que el polifenol se encuentra en una concentración final en el reactivo de 0,15 a 10 mM, de forma especialmente preferente de 0,5 a 2 mM (véanse las reivindicaciones).

En una forma de ejecución especial del procedimiento conforme a la invención, al reactivo de tromboplastina se le añaden dos o más fenoles solubles en agua, de los cuales al menos uno presenta una función catecol. De forma preferente, al reactivo de tromboplastina se le añaden dos polifenoles solubles en agua, donde ambos polifenoles presentan al menos una función catecol. Preferentemente, al reactivo de tromboplastina se le añaden dos o más polifenoles, de manera que cada uno de los polifenoles se encuentra contenido en el reactivo en una concentración final de 0,15 a 10 mM, de forma especialmente preferente de 0,5 a 2 mM. Las combinaciones preferentes de varios polifenoles comprenden la combinación de ácido clorogénico y catequina o la combinación de ácido clorogénico y rutina.

En una forma de ejecución especial del procedimiento conforme a la invención se utiliza al menos un polifenol soluble en agua para la estabilización, el cual presenta al menos una función catecol y proviene del grupo de los flavonoides. Como flavonoides adecuados, solubles en agua y que presentan al menos una función catecol, se consideran por ejemplo:

- quercetina, rutina, miricetina y sus glicósidos, pertenecientes al subgrupo de los flavonoles;

- catequina, galocatequina, epicatequina, galato de epigalocatequina, pertenecientes al subgrupo de los flavan-3-oles;

- procianidina, perteneciente al subgrupo de los polímeros flavan-3-oles;

- luteolina y sus glicósidos, pertenecientes al subgrupo de las flavonas; y

- cianidina, delphinidina, petunidina y sus glicósidos, pertenecientes al subgrupo de las antocianinas.

En una forma de ejecución especialmente preferente del procedimiento conforme a la invención se utiliza al menos catequina o epicatequina para la estabilización.

En otra forma de ejecución especial del procedimiento conforme a la invención se utiliza para la estabilización al menos un polifenol soluble en agua, que presenta al menos una función catecol y proviene del grupo de los ácidos fenólicos. Como ácidos fenólicos adecuados, solubles en agua y que presentan al menos una función catecol, se consideran por ejemplo:

- ácido gálico, ácido protocatéuico (ácido 3,4 dihidroxibenzoico), así como sus ésteres o glicósidos, pertenecientes al subgrupo de los ácidos hidroxibenzoicos; y

- ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido caftárico, cafeoilglucosa, ácido rosmarínico, así como sus ésteres o glicósidos, pertenecientes al subgrupo de los ácidos hidroxicinámicos. En una forma de ejecución especialmente preferente del procedimiento conforme a la invención, para la estabilización se utiliza al menos ácido clorogénico.

5 En otra forma de ejecución del procedimiento conforme a la invención, al reactivo de tromboplastina, para otra estabilización, se le añade adicionalmente ácido L-ascórbico y/o polietilenglicol y/o una sustancia con actividad antimicrobiana. De forma preferente, se añade una cantidad tal de ácido L-ascórbico que en el reactivo se encuentre contenida una concentración final de 0,1 a 10 mM, de forma especialmente preferente de 0,5 a 1 mM. De forma preferente, se añade una cantidad tal de polietilenglicol que en el reactivo se encuentre contenida una concentración final de 0,1 a 5 % (p/v), de forma especialmente preferente de 0,25 a 1 % (p/v). Se consideran como sustancias con actividad antimicrobiana la azida de sodio y el timol. De forma preferente, se añade una cantidad tal de azida de sodio que en el reactivo se encuentre contenida una concentración final de 0,01 a 1 % (p/v), de forma especialmente preferente de 0,1 % (p/v).

15 El procedimiento conforme a la invención es apropiado tanto para estabilizar reactivos de tromboplastina que contienen un factor tisular recombinante (humano o animal, en particular de conejos), junto con fosfolípidos naturales y/o sintéticos, como también para estabilizar reactivos de tromboplastina que contienen un factor tisular natural humano o animal (por ejemplo, de conejos o bovinos) de extractos tisulares (por ejemplo del cerebro, de la placenta, del pulmón), junto con fosfolípidos naturales y/o sintéticos.

20 Otro objeto de la presente invención consiste en una solución acuosa o en un reactivo apropiado para ser utilizado como reactivo de tromboplastina, que contenga factor tisular y fosfolípidos, así como al menos un polifenol acuoso que presente al menos una función catecol. De forma preferente, al menos un polifenol se encuentra contenido en el reactivo en una concentración final de 0,15 a 10 mM, de forma especialmente preferente de 0,5 a 2 mM. Una forma de ejecución preferente de un reactivo conforme a la invención, de forma adicional, contiene iones de calcio. Otras formas de ejecución del reactivo, acordes a la invención, pueden obtenerse a través de las diversas formas de ejecución descritas del procedimiento conforme a la invención. El reactivo puede proporcionarse como reactivo líquido o también como un liofilizado reconstituido en agua en una solución tampón.

30 Otro objeto de la presente invención consiste en la utilización de un reactivo de tromboplastina conforme a la invención en un procedimiento in vitro para determinar un parámetro de coagulación en una muestra de un paciente, en particular para determinar un parámetro de coagulación del grupo del tiempo de protrombina (PT, también prueba rápida) y sus variantes, y del potencial de trombina endógena (ETP). El reactivo conforme a la invención es apropiado para la utilización como activador de la cascada de coagulación, por ejemplo en procedimientos de prueba basados en la detección de un coágulo de fibrina, así como también en procedimientos de prueba cromogénicos o fluorogénicos.

35 Otro objeto de la presente invención consiste en un kit de prueba, en particular para la ejecución de un procedimiento in vitro para determinar un parámetro de coagulación, donde el kit de prueba contiene al menos un reactivo de tromboplastina estabilizado conforme a la invención. En caso de que el reactivo de tromboplastina conforme a la invención se encuentre contenido en el kit como liofilizado, de forma preferente, el kit contiene un medio de reconstitución apropiado (por ejemplo agua destilada o una solución tampón). Se considera como preferente un kit de prueba que contiene un recipiente con un reactivo de tromboplastina líquido.

Descripción de las figuras

40 Figura 1:

Tiempos de protrombina de un plasma de referencia definido (calibrador 4) con reactivos de tromboplastina estabilizados de modo diferente durante un almacenamiento de 12 meses a +2 hasta +8 °C (véase el ejemplo 1), (PEG = polietilenglicol; - azida = azida de sodio).

Figura 2:

45 Tiempos de protrombina de un plasma de referencia definido (calibrador 1) con reactivos de tromboplastina estabilizados de modo diferente durante un almacenamiento de 42 semanas a +2 hasta +8 °C (véase el ejemplo 2), (Cat = catequina; Asc = ácido ascórbico; azida = azida de sodio).

Figura 3:

50 Tiempos de protrombina de un plasma de referencia definido (calibrador 1) con reactivos de tromboplastina estabilizados de modo diferente durante un almacenamiento de 8 semanas a +37 °C (véase el ejemplo 3), (azida = azida de sodio).

Figura 4:

Tiempos de protrombina de un plasma de referencia definido (calibrador 1) con reactivos de tromboplastina estabilizados de modo diferente durante un almacenamiento de 8 semanas a +37 °C (véase el ejemplo 4), (azida = azida de sodio).

5 Figura 5:

Tiempos de protrombina de un plasma de referencia definido (K1 a K6, PT kit multi calibrador, de la empresa Dade Behring Margburg GmbH) con reactivos de tromboplastina estabilizados de modo diferente durante un almacenamiento de 8 semanas a +37 °C (véase el ejemplo 5). Los siguientes ejemplos de ejecución sirven para explicar la presente invención y no deben comprenderse de forma limitativa.

10 **Ejemplo 1: Determinación de la estabilidad de un reactivo de tromboplastina estabilizado con catequina durante un almacenamiento de 12 meses a +2 - +8 °C.**

Un reactivo de tromboplastina liofilizado que contenía factor tisular humano recombinante, fosfolípidos sintéticos e iones de calcio fue reconstituido al momento t0 con agua destilada, y al reactivo disuelto se le añadieron las siguientes sustancias en la concentración final indicada:

- 15 1. sin ningún otro aditivo
2. 0.1 % (p/v) azida de sodio
3. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 % (p/v) PEG
4. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 % (p/v) PEG + 2 mM de ácido ascórbico
5. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 % (p/v) PEG + 1 mM de catequina
- 20 6. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de catequina

Los diferentes reactivos fueron utilizados en una prueba automática de protrombina (PT-Test) en un instrumento de medición de coagulación BCT® (Behring Coagulation Timer, de la empresa Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania). Como muestra se utilizó un plasma de referencia definido (calibrador 4 del kit PT multi calibrador, de la empresa Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania). La muestra y el reactivo fueron precalentados respectivamente a 37° y finalmente fueron mezclados. El proceso de coagulación se inició a través de la adición del reactivo, y se midió el tiempo hasta la formación del coágulo de fibrina.

Para determinar la estabilidad a largo plazo de los diferentes reactivos, los reactivos fueron almacenados en estado líquido a +2 hasta +8°C durante un período de hasta 12 meses. Mensualmente se extrajeron muestras de los reactivos y se determinó el tiempo de protrombina del mismo plasma de referencia. Como control, en todo momento, fue reconstituido nuevamente con agua destilada y medido el reactivo de tromboplastina liofilizado de la misma carga que había sido utilizado para la producción de los diferentes reactivos.

En la figura 1 se muestran los tiempos de protrombina de los diferentes reactivos de tromboplastina durante un período de 12 meses. Sólo con los reactivos de tromboplastina estabilizados con catequina (Nº 5 y 6), conforme a la invención, se alcanzaron tiempos de protrombina estables con divergencias de menos de 25 % con respecto al valor inicial en el momento t0. Todos los otros reactivos, a lo sumo después de 9 meses (véase el Nº 4), proporcionaron sólo tiempos de protrombina altamente divergentes. La azida de sodio no influenció de ningún modo la estabilidad a largo plazo del reactivo. El reactivo Nº 2 (0,1 % azida de sodio; los valores no se muestran) se comportó como el reactivo Nº 1 (sin aditivos). Sin embargo, el reactivo Nº 2 (0,1 % azida de sodio) se mostró claramente menos turbio que el reactivo Nº 1 (sin azida de sodio).

40 **Ejemplo 2: Determinación de la estabilidad de reactivos de tromboplastina estabilizados con catequina durante un almacenamiento de 48 meses a 2 - 8 °C**

Al mismo reactivo de tromboplastina que el descrito en el ejemplo 1 se le añadieron las siguientes sustancias en la concentración final indicada:

7. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de catequina
- 45 8. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 0,5 mM de catequina

9. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 0,1 mM de catequina

10. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 0,5 mM de catequina + 1 mM de ácido L-ascórbico

5 Los distintos reactivos, tal como se describió en el ejemplo 1, fueron utilizados para la determinación del PT de un plasma de referencia definido (calibrador 1 del kit PT multi calibrador, de la empresa Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania).

10 Para determinar la estabilidad a largo plazo de los diferentes reactivos, los reactivos fueron almacenados en estado líquido de +2 a +8 °C durante un período de hasta 48 meses. Cada cuatro semanas se extrajeron muestras de los reactivos, y se determinó el tiempo de protrombina de los mismos plasmas de referencia. Como control, en todo momento, se reconstruyeron nuevamente con agua destilada y se midieron los reactivos de tromboplastina liofilizados de la misma carga que se había utilizado para la producción de los diferentes reactivos.

15 La prueba de almacenamiento muestra que una concentración de 0,1 mM de catequina (reactivo N° 9) no es suficiente para estabilizar el reactivo de tromboplastina durante más de aprox. 32 semanas a +2 - +8 °C (Figura 2). Sin embargo, una concentración de 0,5mM de catequina, así como la combinación de 0,5 mM de catequina y 1 mM de ácido L-ascórbico, consiguen una estabilización del reactivo de tromboplastina durante un período de al menos 48 semanas (figura 2). La extensión de la prolongación observada del tiempo de protrombina después de la adición de catequina, evidentemente, depende de la concentración.

Ejemplo 3: Determinación de la estabilidad de reactivos de tromboplastina estabilizados de diferentes polifenoles durante un almacenamiento de 8 semanas a 37 °C

20 Al mismo reactivo de tromboplastina que el descrito en el ejemplo 1 se le añadieron las siguientes sustancias en la concentración final indicada:

11. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de catequina

12. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de epicatequina

13. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de rutina

14. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de ácido clorogénico

25 15. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 2 mM de ácido clorogénico

Los distintos reactivos, tal como se describió en el ejemplo 1, fueron utilizados para la determinación del PT de un plasma de referencia definido (calibrador 1 del kit PT multi calibrador, de la empresa Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemania).

30 Para determinar la estabilidad a largo plazo de los diferentes reactivos, los reactivos fueron almacenados en estado líquido a +37 °C durante un período de hasta ocho semanas. Después de una semana, cuatro semanas y ocho semanas se extrajeron muestras de los reactivos y se determinaron los tiempos de protrombina del plasma de referencia. Como control, en todo momento, el reactivo de tromboplastina liofilizado de la misma carga que se había utilizado para la producción de los diferentes reactivos, se reconstituyó nuevamente con agua destilada y se midió.

35 El examen de estabilidad forzada a +37 °C muestra que la epicatequina flavan-3-ol (epímero de la catequina), el flavonol glicosido rutina y el derivado del ácido hidroxicinámico ácido clorogénico son igualmente apropiados para estabilizar un reactivo de tromboplastina, en concentraciones comparables como la catequina. El reactivo de tromboplastina pudo ser estabilizado de modo particularmente positivo a través de la adición de 2 mM de ácido clorogénico.

40 **Ejemplo 4: Determinación de la estabilidad de reactivos de tromboplastina estabilizados con diferentes polifenoles durante un almacenamiento de 8 semanas a 37 °C**

Al mismo reactivo de tromboplastina que el descrito en el ejemplo 1 se le añadieron las siguientes sustancias en la concentración final indicada:

16. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de ácido 3,4 dihidroxibenzoico

17. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de ácido cafeico

18. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de ácido clorogénico + 1 mM de ácido L-ascórbico + 0,5 % PEG

Los distintos reactivos, tal como se describió en el ejemplo 1, fueron utilizados para la determinación del PT de un plasma de referencia definido (calibrador 1 del kit PT multi calibrador, de la empresa Dade Behring).

5 Para determinar la estabilidad a largo plazo de los diferentes reactivos, los reactivos fueron almacenados en estado líquido a +37 °C durante un período de hasta ocho semanas. Después de una semana, cuatro semanas y ocho semanas se extrajeron muestras de los reactivos y fueron determinados los tiempos de protrombina del plasma de referencia. Como control, en todo momento, el reactivo de tromboplastina liofilizado de la misma carga que había sido utilizado para la producción de los diferentes reactivos, se reconstituyó nuevamente con agua destilada y se midió.

10 El examen de estabilidad forzado a +37 °C muestra que los polifenoles ácido 3,4 dihidroxibenzoico, ácido cafeico y ácido clorogénico (Nº 16 - 18) son apropiados en las concentraciones utilizadas para la estabilización a largo plazo del reactivo de tromboplastina liofilizado. El reactivo de tromboplastina pudo ser estabilizado de modo particularmente positivo a través de la adición de la combinación de sustancias (Nº 18).

15 **Ejemplo 5: Determinación de la estabilidad de reactivos de tromboplastina estabilizados con varios polifenoles durante un almacenamiento de 8 semanas a 37 °C**

Al mismo reactivo de tromboplastina que el descrito en el ejemplo 1 se le añadieron las siguientes sustancias en la concentración final indicada:

19. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 0,5 mM de catequina + 0,5 mM de ácido clorogénico

20. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 1 mM de ácido clorogénico + 0,5 mM de rutina

20 21. 0.1 % (p/v) azida de sodio + 0,5 mM de ácido clorogénico + 0,5 mM de catequina + 0,5 mM de ácido L-ascórbico

Los distintos reactivos, tal como se describió en el ejemplo 1, fueron utilizados para la determinación del PT de un plasma de referencia definido (K1 a K6 del kit PT multi calibrador, de la empresa Dade Behring). Las curvas de calibración resultantes fueron comparadas unas con otras.

25 Para determinar la estabilidad a largo plazo de los diferentes reactivos, los reactivos fueron almacenados en estado líquido a +37 °C durante un período de hasta ocho semanas. Después de una semana, cuatro semanas y ocho semanas se extrajeron muestras de los reactivos y fueron determinados los tiempos de protrombina del plasma de referencia. Como control, en todo momento, el reactivo de tromboplastina liofilizado de la misma carga que había sido utilizado para la producción de los diferentes reactivos, se reconstituyó nuevamente con agua destilada y se midió.

30 El examen de estabilidad forzado a +37 °C muestra que la combinación de los polifenoles catequina, ácido clorogénico y rutina (Nº 19 - 21) son apropiados en las concentraciones utilizadas para la estabilización a largo plazo del reactivo de tromboplastina liofilizado (figura 5).

REIVINDICACIONES

1. Reactivo que contiene un factor tisular y fosfolípidos, caracterizado porque contiene al menos un polifenol soluble en agua que presenta al menos una función catecol, en una concentración de 0,15 a 10 mM, de forma especialmente preferente de 0,5 a 2 mM.
- 5 2. Reactivo conforme a la reivindicación 1, caracterizado porque contiene dos o más polifenoles solubles en agua, de los cuales al menos uno presenta al menos una función catecol.
3. Reactivo conforme a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque contiene al menos un polifenol soluble en agua del grupo de los flavonoides, el cual presenta al menos una función catecol.
- 10 4. Reactivo conforme a la reivindicación 3, caracterizado porque contiene un flavonoide del grupo quercetina, rutina, miricetina, catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina, luteolina, delphinidina, petunidina y cianidina.
5. Reactivo conforme a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque contiene al menos un polifenol soluble en agua del grupo de los ácidos fenólicos, el cual presenta al menos una función catecol.
- 15 6. Reactivo conforme a la reivindicación 5, caracterizado porque contiene un ácido fenólico del grupo del ácido gálico, ácido protocatéuico, ácido cafeico, ácido rosmarinico, ácido clorogénico y ácido caftárico.
7. Reactivo conforme a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque, de forma adicional, contiene ácido L-ascórbico.
8. Reactivo conforme a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque, de forma adicional, contiene polietilenglicol.
- 20 9. Reactivo conforme a una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque, de forma adicional, contiene al menos una sustancia que presenta actividad antimicrobiana.
10. Reactivo conforme a la reivindicación 9, caracterizado porque contiene una sustancia que presenta actividad antimicrobiana del grupo azida de sodio y timol.
- 25 11. Reactivo conforme a una de las reivindicaciones precedentes, el cual contiene factor tisular recombinante humano, factor tisular recombinante animal, factor tisular de conejo recombinante o factor tisular natural humano o animal de un extracto tisular.
12. Utilización de un reactivo conforme a una de las reivindicaciones precedentes en un procedimiento in vitro para determinar un parámetro de coagulación del grupo de tiempo de protrombina (PT) y potencial de trombina endógena (ETP).
- 30 13. Kit de prueba para ejecutar un procedimiento in vitro para determinar un parámetro de coagulación, caracterizado porque contiene un reactivo conforme a una de las reivindicaciones 1-11.
- 35 14. Procedimiento para estabilizar un reactivo que contiene un factor tisular y fosfolípidos, caracterizado porque al reactivo se le añade al menos un polifenol soluble en agua que presenta al menos una función catecol, de manera que se encuentra contenido en el reactivo en una concentración final de 0,15 a 10 mM, de forma especialmente preferente de 0,5 a 2 mM.

Figura 1

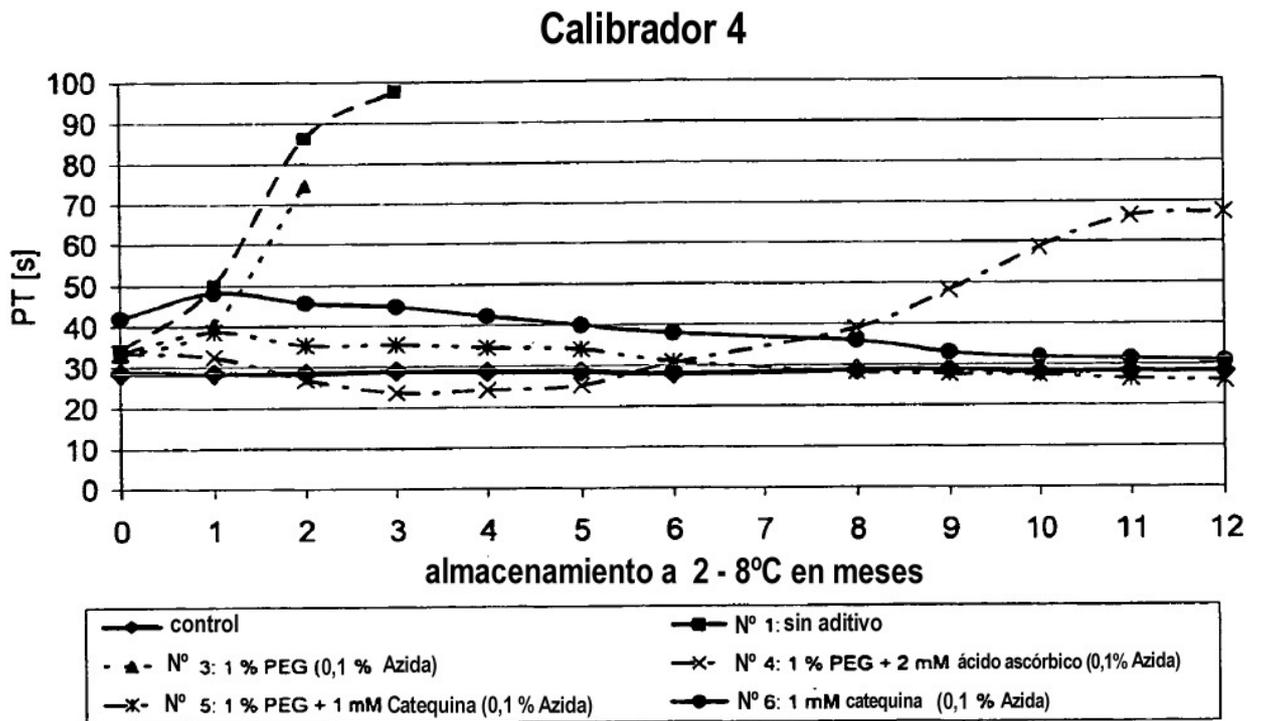


Figura 2

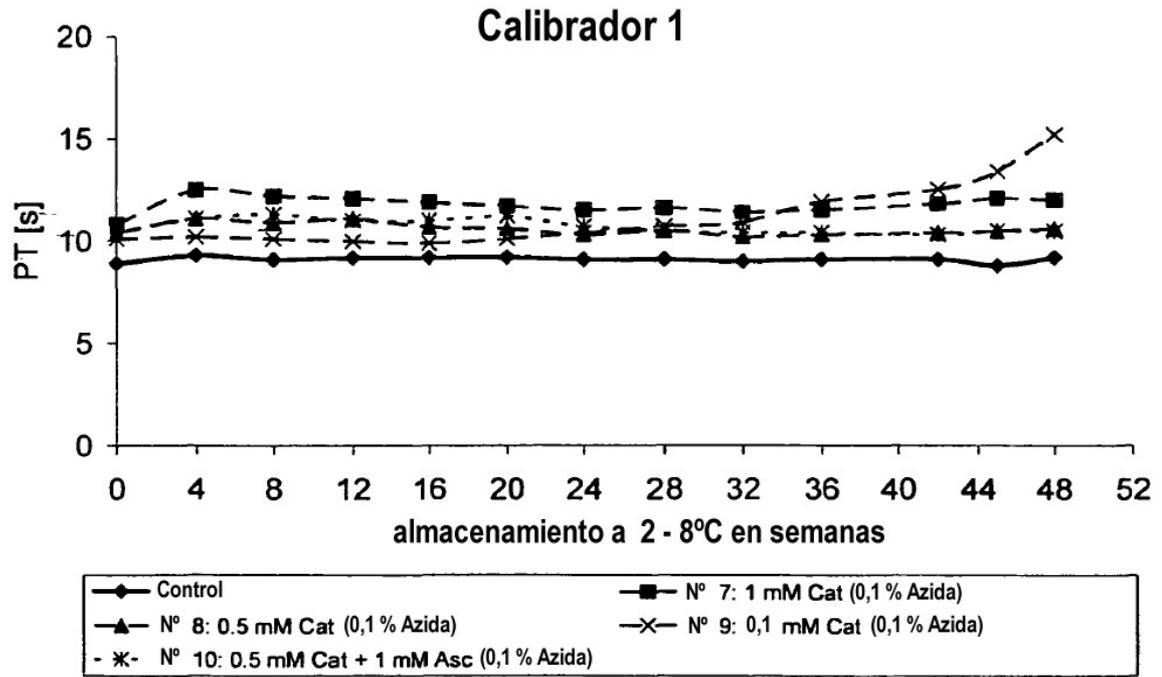


Figura 3

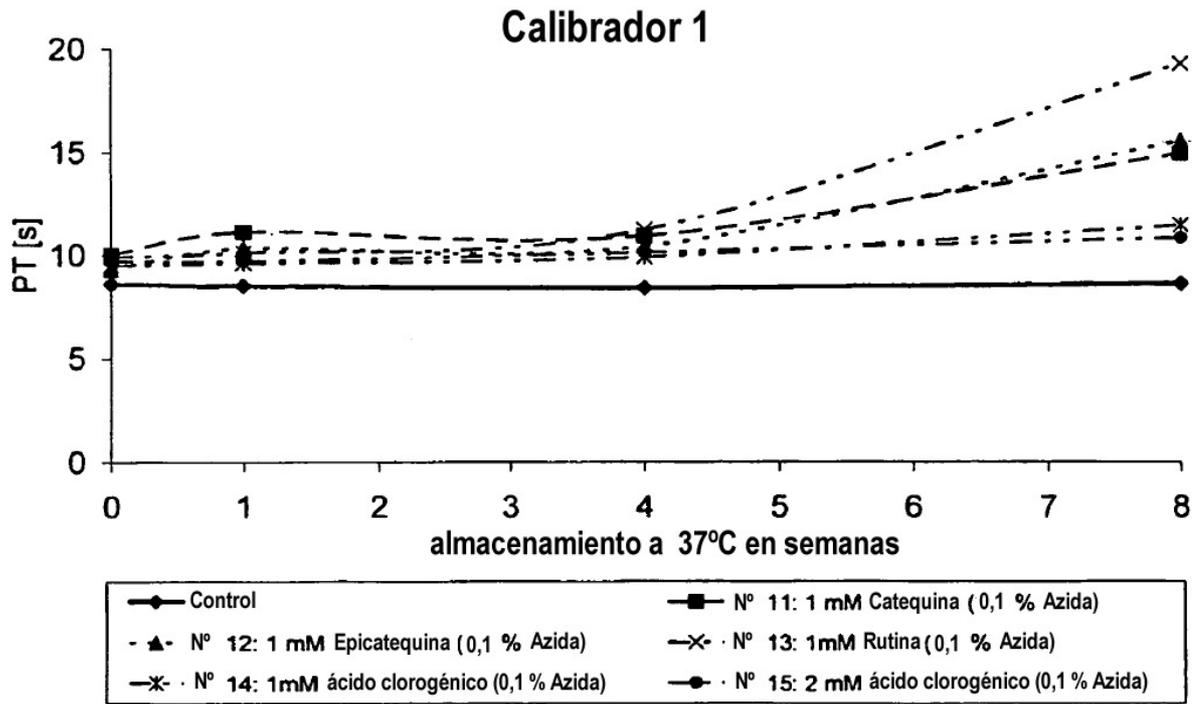


Figura 4

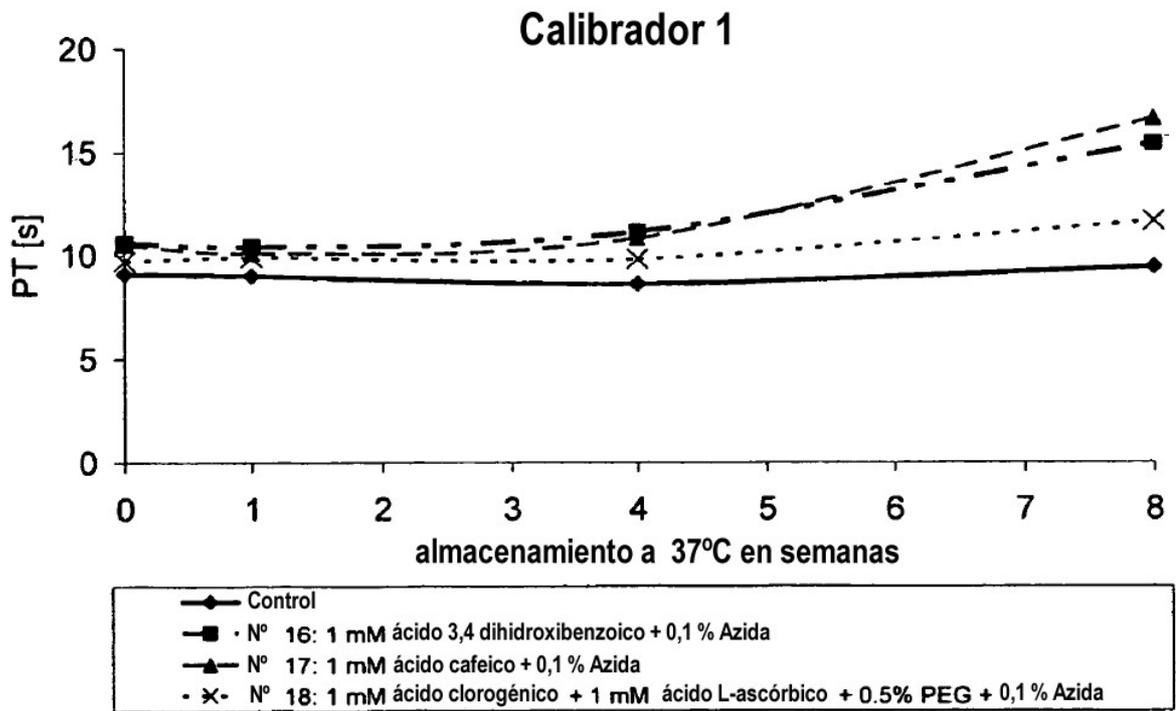


Figura 5

