

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 072**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010** **E 10732641 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013** **EP 2486144**

54 Título: **Procedimiento para la determinación de factor XIII por medio de análogos de NAD(P)H**

30 Prioridad:

05.10.2009 DE 102009048198

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

26.12.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHRIST, GERLINDE;
KAPPEL, ANDREAS y
VITZTHUM, FRANK**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 436 072 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).

DESCRIPCION

Procedimiento para la determinación de factor XIII por medio de análogos de NAD(P)H

La presente invención se sitúa en el campo del diagnóstico in vitro, y se refiere a un procedimiento para la determinación del factor de coagulación sanguíneo XIII (factor XIII, F XIII), así como a un kit de ensayo para la puesta en práctica del procedimiento.

Factor XIII es un factor de coagulación sanguínea que actúa al final de la cascada de coagulación sanguínea, y juega un papel importante para la cicatrización de heridas duradera. En la última fase de la coagulación sanguínea, la formación de fibrina, trombina disocia fibrinógeno. Los monómeros de fibrina producidos de este modo se agregan espontáneamente a fibras largas, y finalmente a un retículo denso, ramificado, constituido por polímeros de fibrina solubles. También el factor XIII se activa mediante trombina, a través de lo cual se produce el factor XIII. El factor XIII ocasiona un reticulado transversal de los polímeros de fibrina, mediante lo cual el coágulo de fibrina se vuelve más estable mecánicamente, menos deformable y más resistente frente a disolución a través de plasmina. Una deficiencia de factor XIII congénita o adquirida puede conducir a tendencia a las hemorragias, cicatrización de heridas deficiente, así como a abortos. Debido a la relevancia clínica, la determinación de factor XIII es un componente importante del diagnóstico de coagulación para la determinación de una deficiencia de factor XIII.

El factor XIIIa, la forma activada de proenzima factor XIII sin actividad catalítica, es una trans-glutaminasa que cataliza la reticulación transversal tridimensional de polímeros de fibrina mediante formación de enlaces de amida intermoleculares entre cadenas laterales de aminoácido de lisilo y glutaminilo de las moléculas de fibrina. En esta reacción se produce amoniaco (NH_3), o bien se liberan iones amonio (NH_4^+). Este fenómeno se aprovecha en diversos procedimientos de ensayo para la determinación de factor XIII: a continuación, el concepto amoniaco es sinónimo de amoniaco e iones amonio.

Muszbek, L. et al. [Clin. Chem. (1985) 31 (1), 35-40] describen un procedimiento para la determinación de factor XIII en muestras de plasma desfibrinadas, activándose el factor XIII de la muestra con trombina para dar factor XIIIa. Además, la muestra se mezcla con β -caseína y etilamina, que sirven como sustratos para la formación de enlaces de amida intermoleculares a través de factor XIIIa. Para identificar cuantitativamente amoniaco liberado en esta reacción, la muestra se mezcla adicionalmente con NADPH (amida de ácido nicotínico-adenina-dinucleótido-fosfato-híbrido) y con componentes de una reacción de indicador dependiente de NADPH, esto es, con glutamato-dehidrogenasa (GLDH) y α -cetoglutarato. En presencia de amoniaco, GLDH transforma α -cetoglutarato en glutamato. Esta reacción consume adicionalmente NADPH, y se produce NADP^+ (amida de ácido nicotínico-adenina-dinucleótido-fosfato), la forma oxidada de NADPH. NADP^+ tiene un espectro de absorción diferente que NADPH, de modo que la absorción (también llamada extinción o densidad óptica) de la carga de ensayo se modifica proporcionalmente al consumo de NADPH, y con ello proporcionalmente a la cantidad de amoniaco, y por consiguiente proporcional a la cantidad, o bien actividad de factor XIII. Alternativamente, en esta carga de ensayo se puede emplear NADH en lugar de NADPH. En contrapartida a NAD(P)^+ , NAD(P)H posee un máximo de absorción en aproximadamente 340 nm, además de un máximo de absorción en aproximadamente 260 nm. La posición exacta de máximos de absorción depende generalmente de diversos parámetros, en especial de las constantes de dielectricidad y del valor de pH de la disolución. En general, el máximo de absorción de NAD(P)H se sitúa en el intervalo de 335 a 345 nm. La medida de la modificación de la absorción de la carga de ensayo en una longitud de onda de 340 nm posibilita la determinación cuantitativa del factor XIII en una muestra.

La EP 336 353 A2, o bien Fickenscher et al. (Thromb Haemost. 1991, 65 (5): 535-40) describen un procedimiento similar, con el que se cuantifica factor XIII a través del amoniaco liberado. La EP 336 353 A2 describe un procedimiento para la determinación de factor XIII en muestra de plasma no tratadas previamente, que contienen fibrina. Para suprimir la producción de coágulo de fibrina en la carga de reacción, la muestra se mezcla adicionalmente con un inhibidor de agregación de fibrina. El factor XIII de la muestra se activa con trombina en presencia de iones Ca^{2+} para dar el factor XIIIa. Además se mezcla la muestra con un péptido sintético, que contiene glutamina, y éster etílico de glicina, que sirven como sustratos para la formación de enlaces de amida intermoleculares mediante factor XIIIa. Para identificar cuantitativamente el amoniaco liberado en esta reacción, la muestra se mezcla adicionalmente con NADH (amida de ácido nicotínico-adenina-dinucleótido-hidruro) y con componentes de una reacción de indicador dependiente de NADH, esto es, con glutamato-dehidrogenasa (GLDH) y α -cetoglutarato. En presencia de amoniaco, GLDH transforma α -cetoglutarato en glutamato. Esta reacción consume adicionalmente NADH, y se produce NAD^+ , la forma oxidada de NADH. NAD^+ tiene un espectro de absorción diferente que NADH, de modo que la absorción de la carga de ensayo se modifica proporcionalmente al consumo de NADH, y con ello proporcionalmente a la cantidad de amoniaco, y por consiguiente proporcionalmente a la cantidad, o bien actividad de factor XIII. Alternativamente, en esta carga de ensayo se puede emplear NADPH en lugar de NADH. La medida de la modificación de la absorción de la carga de ensayo a una longitud de onda de 340 nm posibilita la determinación cuantitativa del factor XIII en una muestra. Un ensayo comercial, que se basa en el principio de ensayo descrito en la EP 336 353 A2, es el ensayo Berichrom® F XIII de Siemens Healthcare Diagnostics.

Los procedimientos descritos tienen el inconveniente de ser relativamente sensibles frente a sustancias interferentes intrínsecas de la muestra. Muestras de pacientes en casos aislados pueden contener concentraciones anómalamente elevadas de una o varias sustancias intrínsecas, es decir, endógenas, que se muestran interferentes al sobrepasar una concentración tolerable en procedimientos de detección fotométricos, y pueden

- 5 provocar un fallo sistemático. Como es sabido, muestras de plasma hemolíticas, ictericas y/o lipémicas, las denominadas muestras HIL, que disponen de concentraciones de hemoglobina, bilirrubina y/o triglicérido anómalamente elevadas, ocasionan problemas. Concentraciones anómalamente elevadas de estas sustancias interferentes se pueden ocasionar mediante un estado patológico del paciente, o bien mediante una obtención o almacenaje de muestra inapropiados.
- 10 Por consiguiente, la presente invención tomaba como base la tarea de poner a disposición un procedimiento para la determinación de factor XIII, que fuera menos propenso a averías frente a sustancias interferentes intrínsecas de la muestra. En especial existía la tarea de poner a disposición un procedimiento que posibilitara la determinación de factor XIII en muestras con concentraciones elevadas de hemoglobina, bilirrubina y/o triglicérido.

La tarea se soluciona modificándose un procedimiento conocido para la determinación de factor XIII, en el que

- 15 a) la muestra se mezcla con I. una sustancia para la activación del factor XIII para dar el factor XIIIa (por ejemplo con trombina en presencia de iones Ca^{2+}), II. con un sustrato aceptor para factor XIIIa (por ejemplo con un péptido que contiene glutamina), III. con un sustrato donador de grupos amino para factor XIIIa (por ejemplo con una amina primaria), IV. con NADH o NADPH, y V. con un agente que, en presencia de amoníaco, puede oxidar NADH para dar NAD^+ (por ejemplo constituido por glutamato-dehidrogenasa y α -cetoglutarato), y
- 20 b) se mide la modificación de la absorción de la carga de ensayo,

de modo que en lugar de NADH o NADPH se emplea un análogo de NADH o NADPH, un denominado análogo de NAD (P) H, que presenta un máximo de absorción, que se sitúa por encima de 350 nm, siendo el análogo de NAD (P) H tio-NAD (P) H o seleno-NAD (P) H.

- 25 Para la simplificación se emplea el término NAD(P)H, si las explicaciones se refieren tanto a la forma fosforilada, como también a la forma no fosforilada de NADH, es decir, si con NADH y NADPH nos referimos a lo mismo. El término NAD(P)⁺ se emplea si las explicaciones se refieren tanto a la forma fosforilada, como también a la forma no fosforilada de NADH en estado oxidado, es decir, si con NAD^+ y NADP^+ nos referimos a lo mismo.

- 30 En el sentido de la presente invención, bajo el concepto "análogo de NAD (P) H" se debe entender una sustancia que, al igual que NAD (P), puede actuar como cosustrato para una deshidrogenasa dependiente de NAD (P) H, que transforma amoníaco. Según la invención se debe tratar de un análogo en el que la forma oxidada y la forma reducida tienen diferentes máximos de absorción, situándose el máximo de absorción de la forma reducida del análogo de NAD (P) H por encima de 350 nm.

- 35 En el caso de análogos de NAD (P) H se trata preferentemente de compuestos orgánicos, cíclicos y heterocíclicos, que permiten una reacción redox basada en el concepto de transferencia de un ion hidruro, es decir, una reacción redox en la que se transfiere el equivalente de un protón con dos electrones.

- 40 En este caso se incluyen compuestos orgánicos, preferentemente compuestos heterocíclicos, que se pueden transformar de una forma quinoide en el caso de reducción, es decir, absorción de un ion hidruro, en una forma benzoide, y viceversa. En especial son preferentes derivados de piridina. En este caso son preferentes análogos estructurales de nicotinamida.

- 45 Existen análogos estructurales de NAD (P) H, en los que el grupo nicotinamida de NAD (P) H se substituyó por otro grupo. En este caso son preferentes compuestos orgánicos, cíclicos y heterocíclicos, que permiten una reacción redox basada en el concepto de transferencia de un ion hidruro, es decir, una reacción redox, en la que se transfiere el equivalente de un protón con dos electrones. En este caso se incluyen en especial compuestos orgánicos, preferentemente compuestos heterocíclicos, que se pueden transformar de una forma quinoide en el caso de reducción, es decir, absorción de un ion hidruro, en una forma benzoide, y viceversa. En especial son preferentes derivados de piridina.

- 50 En el caso de derivados de piridina para el empleo en el procedimiento según la invención se deben excluir análogos que están provistos de un substituyente en posición 4 del anillo de piridina, por ejemplo dinucleótido de 4-metilnicotinamida-adenina. Si bien tales análogos se pueden reducir por vía química, a modo de ejemplo mediante ditionita (M. Jarman and F. Searle: Potential conenzyme inhibitors V - The synthesis and some properties of 4-methylnicotinamide adenine dinucleotide, Biochemical Pharmacology, vol. 21, 455-464, 1972), apenas son apropiados para una transferencia de iones hidruro catalizada por vía enzimática por motivos estéricos.

Existen también análogos estructurales de NAD (P) H, en los que el grupo piridina porta una cadena lateral en posición 3. Como substituyentes entran en consideración preferentemente compuestos carbonílicos, a modo de ejemplo un grupo aldehído, acetilo, ácido carboxílico, tioaldehído, tioacetilo, ácido tiocarboxílico, amida de ácido tiocarboxílico, selenoaldehído, selenoacetilo, ácido selenocarboxílico, amida de ácido selenocarboxílico, etc.

- 5 Existen además análogos estructurales de NAD (P) H con los análogos de piridina 3-acetilpiridina, 3-(carb)-aldehído-piridinas, tionicotinamida y selenonicotinamida. De este grupo es especialmente preferente la tionicotinamida.

Los máximos de absorción de seleno-NAD (P) H, tio-NAD (P) H, 3-acetilpiridina-adenosindinucleótido hidruro y 3-aldehído-piridina-adenosindinucleótido hidruro se sitúan de modo que la reacción se puede seguir, a modo de ejemplo, en aproximadamente 417 nm, 400 nm, 365 nm y 358 nm en cada caso (Werner Hensel, Dagmar Rakow, Wolfram Christ: Convenient method for preparation and purification of nicotinamide mononucleotide analogs. Analytical Biochemistry, 68, 128-137, 1975; Christ, W. and Coper H.: Properties of selenonicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, an analogue of NADP. FEBS Letters, vol. 2, Number 4, 267-269).

El documento US 7 195 891 B2 describe que en un procedimiento espectrométrico para la identificación de mieloperoxidasa (un marcador de infección, o bien inflamación) se pueden emplear NADH, NADPH, tio-NADH, tio-NADPH, acetil-NADH o acetil-NADPH (R)-lactato, al igual que aceptores de electrones.

El documento CN-A-101477129 describe un procedimiento de identificación específico, sensitivo y poco propenso a errores, en el que se emplean, entre otras, las sustancias oxidadas NAD^+ , NADP^+ y/o tio- NAD^+ .

Análogos de NAD (P) H pueden presentar otras propiedades cinéticas enzimáticas que NAD (P) H. A modo de ejemplo, los análogos se pueden hacer reaccionar con mayor dificultad. Esto se puede compensar mediante adaptación de la concentración del análogo, del enzima o de otros componentes en la carga de reacción, al menos parcialmente, desarrollándose la reacción aún en medida suficiente. Un análogo que no se puede transformar por un enzima correspondiente, o que se presenta incluso como inhibidor, no corresponde a la invención. A modo de ejemplo, se puede partir de que los análogos de piridina con un substituyente en posición 4, por ejemplo 4-metilnicotinamida-adenina-dinucleótido, no son apropiados (véase anteriormente).

La búsqueda, o bien el hallazgo de análogos de NAD (P) H se puede efectuar con ayuda de reacciones enzimáticas, que se catalizan por dehidrogenasas dependientes de NAD (P) H. A modo de ejemplo, los sistemas que se emplean también en un ensayo F XIII se pueden emplear en un correspondiente procedimiento de rastreo. Para la identificación de análogos de NAD (P) H, que son apropiados para empleo en el procedimiento según la invención, en primer lugar se determinan preferentemente sus propiedades espectrales. Preferentemente se determinan las propiedades espectrales de la forma reducida. Un análogo debe presentar un máximo de absorción por encima de 350 nm. El correspondiente análogo se añade a una disolución de ensayo, y se sigue la modificación de la absorción en el intervalo de longitudes de onda relevante. En este caso, el análogo se emplea preferentemente en diferentes concentraciones. A modo de ejemplo, a tal efecto se pueden pipetear 20 μm de una disolución de la forma reducida de un análogo con diferentes concentraciones en 2880 μl de una disolución de ensayo, pH 7,9, que contiene 84,7 mM de tampón imidazol, 13,6 mM de 2-oxoglutarato, 217 mM de acetato amónico, 0,9 mM de tetraacetato de etilendiamina y 1,7 mM de adenosin-5'-difosfato. Si se hace reaccionar, es decir, si se oxida el análogo reducido, se efectúa un descenso de la absorción, que se puede seguir por vía fotométrica.

La síntesis de análogos de NAD (P) H se puede efectuar a través de análogos de piridina, que se sintetizan en primer lugar por vía química, se alquilan igualmente por medio de procedimientos químicos para dar los análogos de mononucleótido, para condensarse después, a modo de ejemplo, por vía enzimática con ayuda de una NAD-pirofosforilasa, o por vía química con adenosintrifosfato (ATP) o adenosindifosfato (ADP) para dar el correspondiente análogo de NAD (P) +, o bien NAD (P) H-. Por regla general, de este modo se sintetiza en primer lugar la forma oxidada, es decir, el análogo de NAD (P)+. La reducción de difosfopiridinnucleótido, o bien del análogo de NAD (P)+, se puede efectuar, a modo de ejemplo, mediante ditionita (Werner Hensel, Dagmar Rakow, Wolfram Christ: Convenient method for preparation and purification of nicotinamide mononucleotide analogs, Analytical Biochemistry, 68, 128-137, 1975; M. Jarman and F. Searle: Potential coenzyme inhibitors V-The synthesis and some properties of 4-methylnicotinamide adenine dinucleotide, Biochemical Pharmacology, vol. 21, 455-464, 1972).

Ya que tio-NAD (P) H presenta un máximo de absorción que se sitúa muy especialmente en el intervalo de onda más larga en comparación con otros análogos, además se puede transformar convenientemente por la mayor parte de dehidrogenasas por vía enzimática, es relativamente estable y se encuentra disponible comercialmente, éste análogo de NAD (P) H es preferente de modo muy especial. Otro análogo de NAD (P) H preferente es seleno-NAD (P) H.

Tio-NADH (amida de ácido tionicotínico-adenina-dinucleótido-hidruro), o bien tio-NADPH (amida de ácido tionicotínico-adenina-dinucleótido-fosfato-hidruro), se pueden oxidar de modo análogo a NADH y NADPH, esto es, para dar tio-NAD+, o bien tio-NADP+, y como es sabido disponen de propiedades ópticas diferentes a las de NADH,

o bien NADPH, de modo que se puede medir una modificación de la absorción a consecuencia de la oxidación para dar tio-NAD⁺, o bien tio-NADP⁺, con longitudes de onda de aproximadamente 340 nm a aproximadamente 430 nm.

Un objeto de la presente invención es el empleo de tio-NADH, o bien tio-NADPH (es decir, tio-NAD (P) H) en un procedimiento para la determinación de factor XIII en una muestra.

- 5 Otro objeto de la presente invención es el empleo de seleno-NADH, o bien de seleno-NADPH (es decir, seleno-NAD (P) H) en un procedimiento para la determinación de factor XIII en una muestra.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la determinación de factor XIII en una muestra, en el que

a) la muestra se combina con uno o varios reactivos que contienen

- 10 I. una sustancia o una mezcla de sustancias para la activación del factor XIII para dar el factor XIIIa,
- II. un sustrato aceptor para factor XIIIa con al menos un grupo glutaminilo,
- III. un sustrato donador de grupos amino para factor XIIIa,
- IV. un análogo de NAD (P) H con un máximo de absorción que se sitúa por encima de 350 nm, y
- 15 V. un agente que, en presencia de amoníaco, es capaz de oxidar NAD (P) H para dar NAD (P) ⁺ o un análogo de NAD (P) H para dar el correspondiente análogo de NAD (P) ⁺,

y

b) se mide la modificación de la absorción de la carga de ensayo,

y siendo el análogo de NAD (P) H tio-NAD (P) H o seleno-NAD (P) H.

- 20 Como sustancia para la activación del factor XIII para dar factor XIIIa es apropiada en especial trombina, a modo de ejemplo de origen animal o bovino, o también trombina obtenida por vía recombinante. Del mismo modo son apropiadas sustancias o mezclas de sustancias, como por ejemplo factor Xa, el veneno de serpiente ecarina, o una mezcla de Tissue factor, fosfolípidos e iones Ca²⁺, que ocasionan indirectamente una activación del factor XIII, activando directa o indirectamente la protrombina contenida en la muestra, que activa a su vez el factor XIII.

- 25 Bajo el concepto "sustrato aceptor para factor XIIIa con al menos un grupo glutaminilo" se debe entender un polipéptido o mimético de péptido, que presenta al menos un grupo glutaminilo, a modo de ejemplo del aminoácido amida de ácido glutámico. Sustratos aceptores conocidos para factor XIIIa son, por ejemplo, β-caseína, así como una pluralidad de péptidos sintéticos. Se describen péptidos sintéticos apropiados, a modo de ejemplo, en la EP 314 023 A2.

- 30 Bajo el concepto "sustrato donador de grupos amino para factor XIIIa" se debe entender en especial aminas primarias. Aminas primarias preferentes son etanolamina, putrescina, cadaverina, diaminoetano, aminoetano. Aminas primarias especialmente preferente son glicinetiléster o glicinmetiléster.

- Un "agente que es capaz de oxidar NADH para dar NAD⁺ en presencia de amoníaco" es preferentemente un sistema enzima/sustrato que comprende un enzima y un sustrato para el enzima, actuando el enzima catalíticamente sobre el sustrato, y oxidando, en este caso en presencia de amoníaco, NADH para dar NAD⁺, o bien NADPH para dar NADP⁺ (es decir, NAD (P) H para dar NAD (P) ⁺), y con ello también tio-NADH para dar tio-NAD⁺, o bien tio-NADPH para dar tio-NADP⁺, u otros análogos de NAD (P) H según la invención.
- 35

- Sistemas enzima/sustrato apropiados son dehidrogenasas y sus sustratos, que hacen reaccionar NAD (P), o bien análogos de NAD (P) H como cofactor conjuntamente con amoníaco. En este caso se trata en especial de dehidrogenasas de aminoácido, como dehidrogenasas de D-aminoácido y dehidrogenasas de L-aminoácido. Son ejemplos a tal efecto la alanin-, glutamato-, serin-2-, valin-, leucin-, glicin-, lisin-, triptófano-, fenilalanin-, aspartato-, diaminopimelato-, N-metilalanin-, L-eritro-3,5-diaminohexanoato- y la 2,4-diaminopentanoato-dehidrogenasa. Los respectivos sustratos para el sentido de reacción de aminación descrito son amoníaco, así como los respectivos compuestos oxo. Correspondientemente al orden de los anteriores ejemplos, éstos son los 2-oxoácidos para las dehidrogenasas de aminoácido, así como piruvato, alfa-cetoglutarato (2-oxoglutarato), 3-hidroxipiruvato, 3-metil-2-oxobutanoato, 4-metil-2-oxopentanoato, glioxilato, 1,2-didehidropiperidin-2-carboxilato, indol-3-il-piruvato,
- 40
- 45

fenilpiruvato, oxaloacetato, L-2-amino-6-oxiheptanodioato, piruvatos y metilamina, (S)-5-amino-3-oxohexanoatos, y L-2-amino-6-oxoheptanodioatos. Por lo tanto, sistemas enzima/substrato apropiados son, por ejemplo, el sistema glutamato-dehidrogenasa/cetoglutarato o el sistema alanindehidrogenasa/piruvato, o el sistema serin-2-dehidrogenasa/3-hidroxipurivato, o el sistema valindehidrogenasa/3-metil-2-oxobutanoato, o el sistema leucin-dehidrogenasa/4-metil-2-oxopentanoato, o el sistema glicindehidrogenasa/glioxilato, o el sistema lisin-dehidrogenasa/1,2-didehidropiperidin-2-carboxilato, o el sistema fenilalanina/fenilpiruvato, o el sistema aspartato-dehidrogenasa/oxaloacetato, o el sistema glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa/D-glucono-1,5-lactona-6-fosfato.

En una forma preferente de ejecución del procedimiento según la invención se mezcla la muestra, preferentemente una muestra de plasma, de modo adicional con un inhibidor de agregación de fibrina. Inhibidores de agregación de fibrina son sustancias que impiden la agregación de monómeros de fibrina inducidos por trombina. De este modo se impide la producción de un coágulo de fibrina en una muestra que contiene fibrinógeno, que, por lo demás, influiría negativamente sobre la medida de absorción de la carga de ensayo. Inhibidores de agregación de fibrina preferentes son péptidos sintéticos, como por ejemplo un péptido de la secuencia Gly-Pro-Arg-Pro (adquirible comercialmente como Pefabloc®FG, Pentapham, Suiza). Otros péptidos preferentes, que se pueden emplear como inhibidor de agregación de fibrina, en especial el péptido preferente de la secuencia Gly-Pro-Arg-Pro-Ala, se describen en la EP 456 152 A2.

En otra forma de ejecución se mezcla la muestra adicionalmente con una sustancia neutralizante de heparina, a modo de ejemplo con bromuro de hexadimetrina, también conocido como Polybrene®, para eliminar la acción inhibidora de trombina de heparina, que puede estar presente, por ejemplo, en muestras de pacientes sometidos a terapia de heparina.

Los componentes I a V, que se mezclan con la muestra para dar una carga de ensayo, se pueden mezclar en cada caso por separado, es decir, en forma de reactivos aislados y sucesivamente con la muestra; pero también pueden estar reunidos en un único reactivo que se mezcla con la muestra en un único paso de pipeteado. El reactivo o los reactivos comprenden preferentemente una matriz tampón en la que están disueltas las sustancias. Una matriz tampón apropiada contiene, por ejemplo, HEPES, bicina, NaCl, albúmina y/o agente conservante, como por ejemplo azida sódica, y tiene preferentemente un valor de pH de 6,0 a 9,0, de modo especialmente preferente de 6,5 a 8,5. Ya que para la activación de FXIII son necesarios iones calcio, la matriz tampón contiene además una sal de calcio, preferentemente cloruro de calcio. El mezclado del reactivo o de los reactivos con la muestra se puede efectuar manualmente o en aparatos de medida de coagulación automáticos.

La cantidad de análogo de NAD (P) H, que se añade a la carga de ensayo, se debe optimizar según qué agente, que es capaz de oxidar en presencia de amoniaco el análogo de NAD (P) H para dar el correspondiente análogo de NADP⁺, se emplee. En el caso de empleo del sistema glutamatodehidrogenasa/cetoglutarato, éste se selecciona, a modo de ejemplo para tio-NADH, preferentemente de modo que la concentración final de tio-NADH en la carga de ensayo ascienda a 10-500 µM, preferentemente 50-400 µM.

En tanto en el procedimiento según la invención se emplee el sistema glutamatodehidrogenasa/cetoglutarato como agente que es capaz de oxidar NADH para dar NAD en presencia de amoniaco, la cantidad de glutamatodehidrogenasa que se añade a la carga de ensayo se selecciona de modo que la concentración final en la carga de ensayo ascienda a 2-500 IU/mL, preferentemente 5-250 IU/mL.

Como material de muestra es apropiado en especial plasma que contiene fibrinógeno. No obstante, también en plasma defibrinado se puede determinar factor XIII conforme al procedimiento según la invención.

La medida de la modificación de absorción (ΔE) de la carga de ensayo se efectúa con ayuda de un fotómetro, que comprende una fuente de luz, que envía un haz de luz a través de la carga de ensayo a medir, y un detector, que mide la intensidad de la luz que atraviesa, y la transforma en una señal eléctrica. La medida de la modificación de absorción se efectúa con luz de una longitud de onda de aproximadamente 340 nm a aproximadamente 430 nm, preferentemente con luz de una longitud de onda de aproximadamente 380 a aproximadamente 420 nm, de modo muy especialmente preferente con luz de una longitud de onda de aproximadamente 390 a aproximadamente 410 nm. La absorción que varía por unidad de tiempo se correlaciona con la actividad de factor XIII. El descenso de la absorción (E) de la carga de reacción debido al consumo de tio-NADH, o bien tio-NADPH, es directamente proporcional a la actividad de factor XIII en especial en el intervalo lineal de la cinética de reacción. La actividad de factor XIII de una muestra se presenta preferentemente mediante la comparación con una muestra de cubeta de plasma normal, que presenta por definición una actividad de factor XIII de un 100 %.

Otro objeto de la presente invención es un kit de ensayo para la puesta en práctica del procedimiento según la invención para la determinación de factor XIII en una muestra, comprendiendo el kit de ensayo los siguientes componentes:

1. un primer reactivo que contiene una sustancia o una mezcla de sustancias para la activación del factor XIII para dar el factor XIIIa, preferentemente trombina;

2. un segundo reactivo que contiene

* al menos un sustrato aceptor con al menos un grupo glutamínico para factor XIIIa, preferentemente un péptido sintético, que presenta al menos un resto glutamínico como aceptor de amina,

* al menos un sustrato donador de grupos amino para factor XIIIa, preferentemente una amina primaria, y

* al menos un agente que, en presencia de amoníaco, es capaz de oxidar NAD (P) H para dar NAD (P) + o un análogo de NAD (P) H para dar el correspondiente análogo de NAD (P) +, estando constituido el agente preferentemente por glutamato-dehidrogenasa y cetoglutarato; y

3. un tercer reactivo que contiene al menos un análogo de NAD (P) H con un máximo de absorción que se sitúa por encima de 350 nm, y siendo el análogo de NAD (P) H tio-NAD (P) H o seleno-NAD (P) H.

Los reactivos pueden contener adicionalmente agentes conservantes, sales, sustancias tampón y/o estabilizadores, como por ejemplo azida sódica y albúmina. Los reactivos se pueden disponer como reactivos líquidos o como liofilizados. Para el caso de que algunos o todos los reactivos del kit de ensayo se presenten como liofilizados, el kit de ensayo puede contener adicionalmente los disolventes necesarios para la disolución de los liofilizados, como por ejemplo agua destilada y/o tampones apropiados.

En un kit de ensayo preferente, el primer reactivo, que contiene trombina para la activación del factor XIII para dar factor XIIIa, comprende adicionalmente cloruro de calcio y/o un inhibidor de agregación de fibrina y/o bromuro de hexadimetrina.

Descripción de figuras

Figura 1

Determinación de factor XIII con tio-NADH. El descenso de absorción de la carga de ensayo se comporta proporcionalmente respecto a la concentración de factor XIII en la muestra (véase ejemplo 1).

Figura 2

Determinación de factor XIII en muestras de plasma mezcladas con hemoglobina (véase ejemplo 2). La figura superior muestra los resultados del ensayo NADH F XIII. La figura inferior muestra los resultados del ensayo tio-NADH F XIII según la invención. Las líneas horizontales discontinuas marcan la desviación del 10 % del valor de partida a 0 mg/mL de hemoglobina. El ensayo tio-NADH F XIII sobrepasa el límite del 10 % sólo con concentraciones de hemoglobina sensiblemente más elevadas en comparación con el ensayo NADH F XIII conocido.

Figura 3

Determinación de factor XIII en muestras de plasma mezcladas con colesterol (véase ejemplo 2). La figura superior muestra los resultados del ensayo NADH F XIII. La figura inferior muestra los resultados del ensayo tio-NADH F XIII. Las líneas horizontales discontinuas marcan la desviación del 10 % del valor de partida a 0 mg/mL de colesterol. En contrapartida con el ensayo NADH F XIII conocido, el ensayo tio-NADH F XIII según la invención no sobrepasa en absoluto el límite del 10 % a las concentraciones de colesterol sometidas a ensayo en este caso.

Figura 4

Determinación de factor XIII en muestras de plasma mezcladas con bilirrubina (véase ejemplo 2). La figura superior muestra los resultados del ensayo NADH F XIII. La figura inferior muestra los resultados del ensayo tio-NADH F XIII según la invención. Las líneas horizontales discontinuas marcan la desviación del 10 % del valor de partida a 0 mg/mL de bilirrubina. En contrapartida con el ensayo NADH F XIII conocido, el ensayo tio-NADH F XIII según la invención no sobrepasa en absoluto el límite del 10 % a las concentraciones de bilirrubina sometidas a ensayo en este caso.

Ejemplos

Ejemplo 1

Determinación de factor XIII por medio de tio-NADH según la invención

Se obtuvo los siguientes reactivos.

Reactivo activador (pH 8,3):

* tio-NADH 292 μ M (Oriental Yeast Company, Rotterdam, Holanda)

5 * trombina de vaca (10 IU/mL)

* Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-amida como inhibidor de agregación de fibrina (2 g/L)

* cloruro de calcio (1,2 g/L)

* bromuro de hexadimetrina (10 mg/L)

* albúmina de vaca

10 * tampón bicina (100 mmol/L)

Reactivo de identificación (pH 6,5):

* glutamatodehidrogenasa 260 (IU/mL)

* Leu-Gly-Pro-Gly-Gln-Ser-Lys-Val-Ile-Gly-amida como sustrato aceptor de F XIII (2,4 g/L)

* ADP

15 * glicinetiléster (1,4 g/L)

* α -cetoglutarato (2,7 g/L)

* albúmina de vaca

* tampón HEPES (10 mmol/L)

20 Para el ensayo se reunieron en una cubeta y se incubaron a 37°C en el analizador de coagulación BCS®-XP (Siemens Healthcare Diagnostics Products, GmbH, Marburg, Alemania) 75 μ L de reactivo activador, 75 μ L de reactivo de identificación y 75 μ L de muestra. Después de 5 minutos se inició la medida de la absorción a una longitud de onda de 405 nm. Para la valoración se calculó la modificación de la absorción por minuto a 405 nm en un intervalo de tiempo de 60 segundos - 350 segundos tras el inicio de la medida. Para el calibrado se empleó plasma humano standard (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania) como patrón con una
25 concentración de factor XIII de un 102 % de la norma (porcentaje de norma). Se obtuvo puntos de calibrado con concentración de factor XIII más reducida mediante dilución del patrón en disolución de NaCl al 0,9 %, puntos de calibrado con concentración de factor XIII más elevada mediante un volumen elevado de patrón en el ensayo. La figura 1 muestra una curva de calibrado típica.

Ejemplo 2

30 **Determinación de factor XIII por medio de tio-NADH en muestras de HIL según la invención**

Se mezcló plasma humano standard (SHP, Siemens Healthcare Diagnostics) con concentraciones crecientes de hemoglobina, bilirrubina, triglicéridos o colesterol, que se añadieron con dosificación al plasma en cada caso en un volumen constante. A tal efecto se mezclaron 540 μ L de SHP con 60 μ L de una disolución de la respectiva
35 substancia en diferentes concentraciones. A tal efecto se disolvió hemoglobina en disolución salina tri-tamponada (TBS: NaCl 150 mM, tris 50 mM, pH 7,6), colesterol en TBS con 40 mg/mL de albúmina de suero humana, y bilirrubina disuelta en NaOH 0,05 M y el SHP. Para la determinación del valor de partida se mezclaron 540 μ L de SHP con 60 μ L de la respectiva disolución tampón sin sustancia añadida. A continuación se determinó la actividad de factor XIII de las muestras de plasma mezcladas de este modo con ayuda del procedimiento según la invención, por medio de tio-NADH (véase ejemplo 1) en determinación triple. Como comparación se determinaron las mismas
40 muestras con ayuda del ensayo Berichrom® FXIII (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania), en el que se emplea NADH, según los datos del fabricante en determinación triple. En el caso de una

desviación de los resultados de medida para las muestras mezcladas de los resultados de medida para las muestras no mezcladas de más de un 10 % se da una interferencia, es decir, no es posible una determinación de factor XIII fiable.

5 Los resultados para las muestras mezcladas con hemoglobina, colesterol y bilirrubina se representan en las figuras 2 a 4.

10 En la tabla 1 se indican las concentraciones de sustancias interferentes hasta la que no se observa una interferencia con el ensayo Berichrom® FXIII (abreviado: ensayo NADH F XIII), o bien con el procedimiento según la invención (abreviado: ensayo tio-NADH F XIII). La comparación de ambos ensayos muestra que el ensayo según la invención tolera concentraciones de sustancias interferentes más elevadas, es decir, es menos propenso a fallos frente a sustancias interferentes intrínsecas de la muestra. En el caso de las sustancias interferentes colesterol, o bien bilirrubina, el ensayo tio-NADH según la invención tolera incluso la cantidad añadida con dosificación máxima, de modo que una interferencia se presenta probablemente sólo a concentraciones más elevadas que en la tabla 1.

Tabla 1

	Sin interferencia hasta:		
Ensayo F XIII	Hemoglobina	Colesterol	bilirrubina
NADH	4 mg/mL	4 mg/mL	0,36 mg/mL
Tio-NADH	8 mg/mL	5 mg/mL	0,6 mg/mL

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la determinación de factor XIII en una muestra, en el que
 - a) la muestra se combina con uno o varios reactivos que contienen
 - I. una substancia o una mezcla de substancias para la activación del factor XIII para dar el factor XIIIa,
 - II. un sustrato aceptor para factor XIIIa con al menos un grupo glutamínico,
 - III. un sustrato donador de grupos amino para factor XIIIa,
 - IV. un análogo de NAD (P) H con un máximo de absorción que se sitúa por encima de 350 nm, y
 - V. un agente que, en presencia de amoníaco, es capaz de oxidar NAD (P) H para dar NAD (P) + o un análogo de NAD (P) H para dar el correspondiente análogo de NAD (P) +,
 - y
 - b) se mide la modificación de la absorción de la carga de ensayo, y siendo el análogo de NAD (P) H tio-NAD (P) H o seleno-NAD (P) H.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, mezclándose además la muestra con un inhibidor de agregación de fibrina en el paso a).
- 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo trombina la substancia para la activación del factor XIII para dar factor XIIIa.
- 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo el sustrato aceptor para factor XIIIa con al menos un grupo glutamínico un polipéptido que presenta al menos un resto glutamina como aceptor de amina.
- 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo el sustrato donador de grupos amino para factor XIIIa una amina primaria, preferentemente una amina primaria del grupo etanolamina, putrescina, cadaverina, diaminoetano, aminoetano, glicinmetiléster y glicinmetiléster.
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo el agente que, en presencia de amoníaco, es capaz de oxidar NAD (P) H para dar NAD (P) + o un análogo de NAD (P) H para dar el correspondiente análogo de NAD (P) + un enzima y un sustrato para el enzima.
- 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, siendo el enzima glutamatodehidrogenasa y el sustrato para el enzima α -cetoglutarato.
- 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, mezclándose la muestra además con una substancia neutralizante de heparina en el paso a), preferentemente con bromuro de hexadimetrina, y/o con cloruro de calcio.
- 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, midiéndose la modificación de la absorción de la carga de ensayo con luz de una longitud de onda de aproximadamente 340 nm a aproximadamente 430 nm, preferentemente con luz de una longitud de onda de aproximadamente 380 nm a aproximadamente 420 nm, de modo muy especialmente preferente con luz de una longitud de onda de aproximadamente 390 a aproximadamente 410 nm.
- 10.- Empleo del análogo de NAD (P) H tio-NAD (P) H en un procedimiento para la determinación de factor XIII en una muestra.
- 11.- Empleo del análogo de NAD (P) H seleno-NAD (P) H en un procedimiento para la determinación de factor XIII en una muestra.
- 12.- Kit de ensayo para la puesta en práctica de un procedimiento para la determinación de factor XIII en una muestra, comprendiendo el kit de ensayo los siguientes componentes:

a. un primer reactivo que contiene una substancia o una mezcla de substancias para la activación del factor XIII para dar el factor XIIIa, preferentemente trombina;

b. un segundo reactivo que contiene

* al menos un sustrato aceptor con al menos un grupo glutamilo para factor XIIIa,

5 * al menos un sustrato donador de grupos amino para factor XIIIa, preferentemente una amina primaria, y

* al menos un agente que, en presencia de amoníaco, es capaz de oxidar NAD (P) H para dar NAD (P) + o un análogo de NAD (P) H para dar el correspondiente análogo de NAD (P) +, estando constituido el agente preferentemente por glutamato-dehidrogenasa y α -cetoglutarato; y

10 c. un tercer reactivo que contiene al menos un análogo de NAD (P) H con un máximo de absorción que se sitúa por encima de 350 nm, y siendo el análogo de NAD (P) H tio-NAD (P) H o seleno-NAD (P) H.

13.- Kit de ensayo según la reivindicación 12, conteniendo el primer reactivo trombina para la activación del factor XIII para dar factor XIIIa, y adicionalmente cloruro de calcio y/o inhibidor de agregación de fibrina y/o bromuro de hexadimetrina.

15

Figura 1

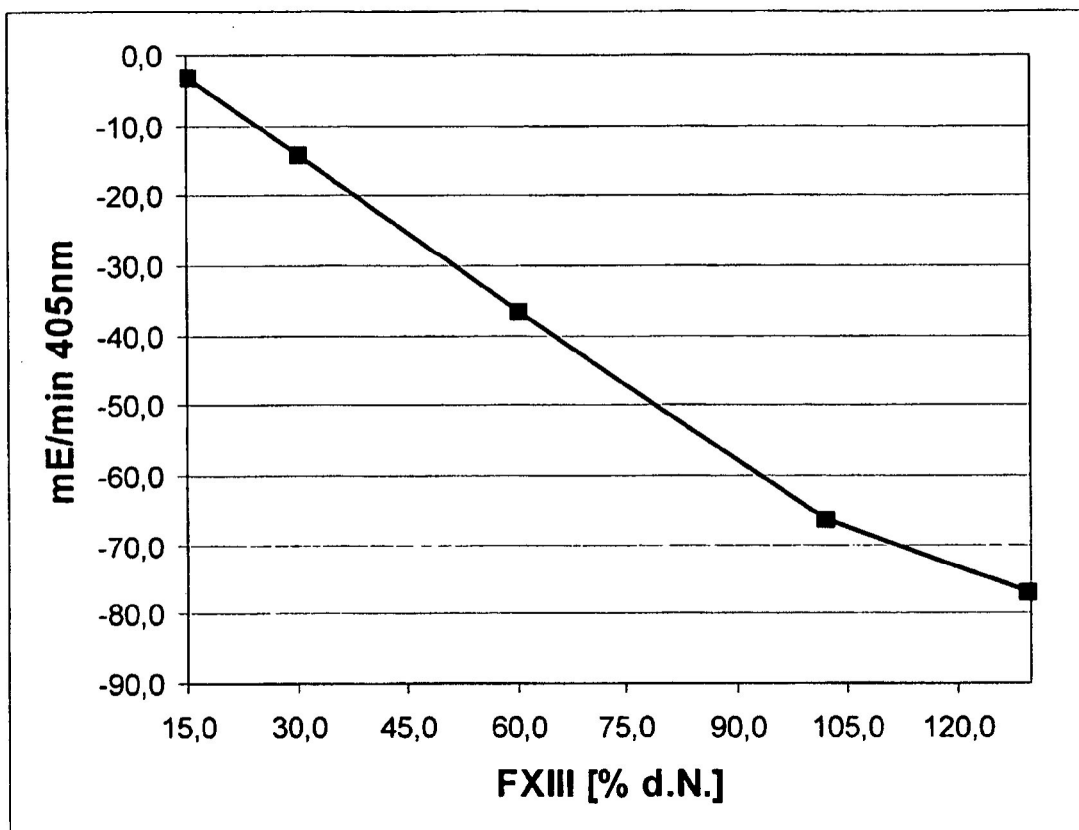


Figura 2

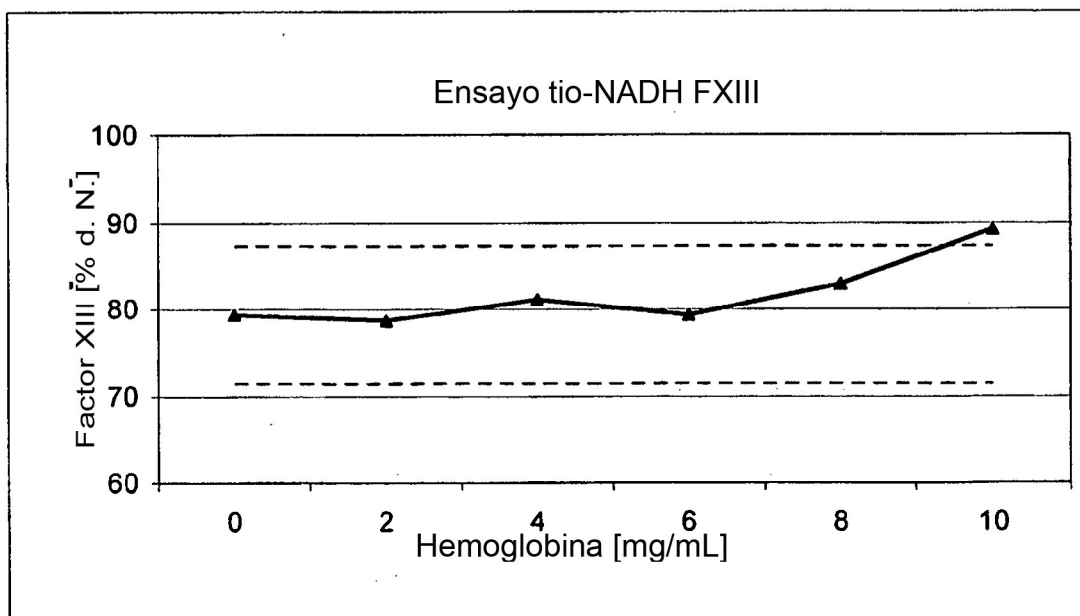
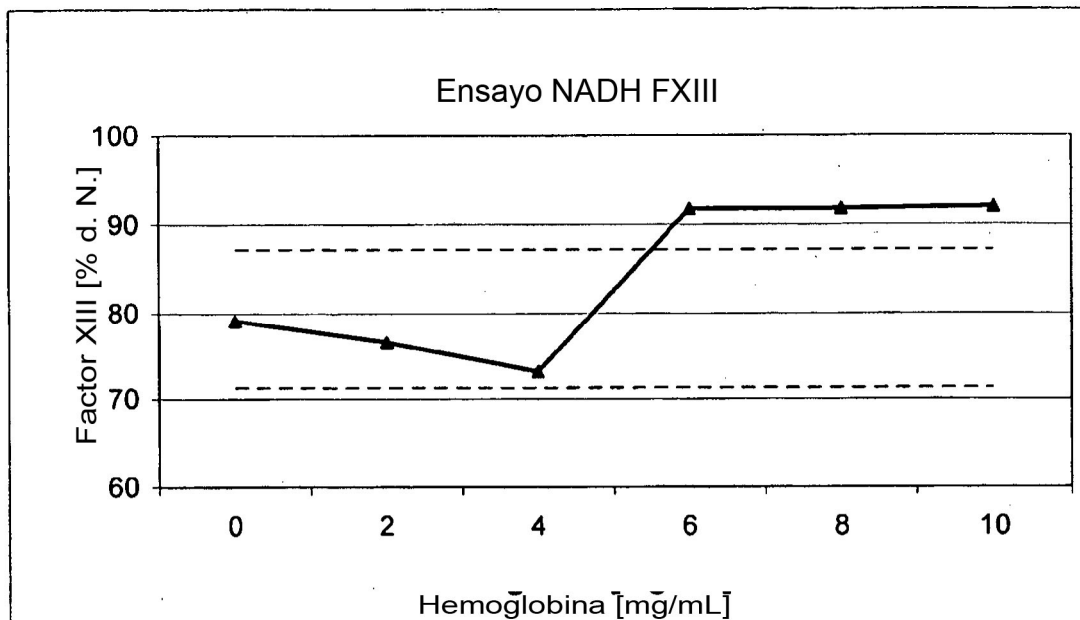


Figura 3

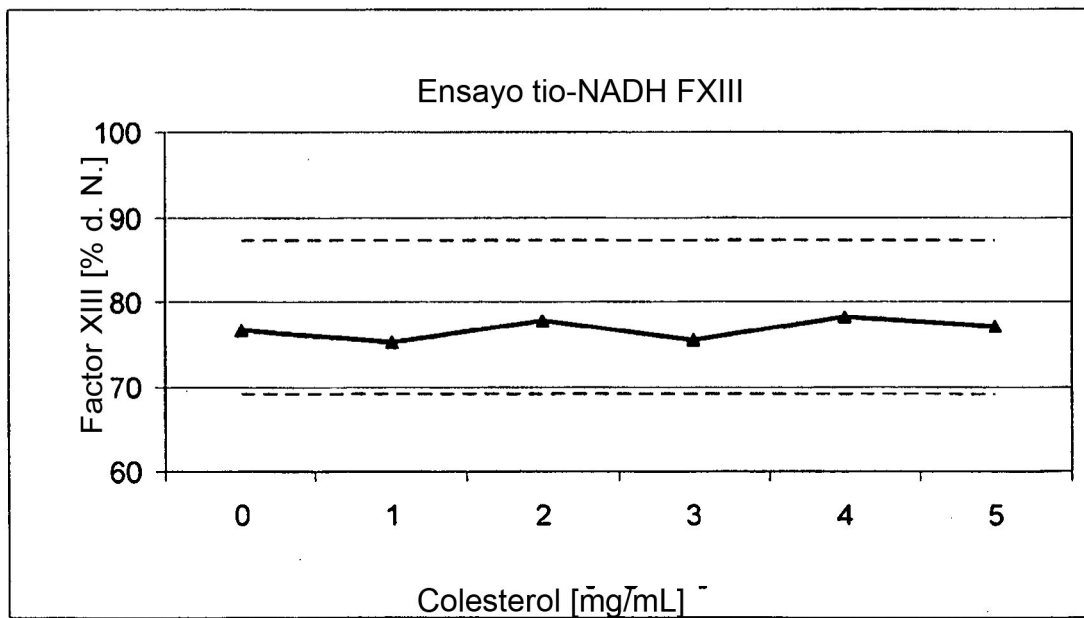
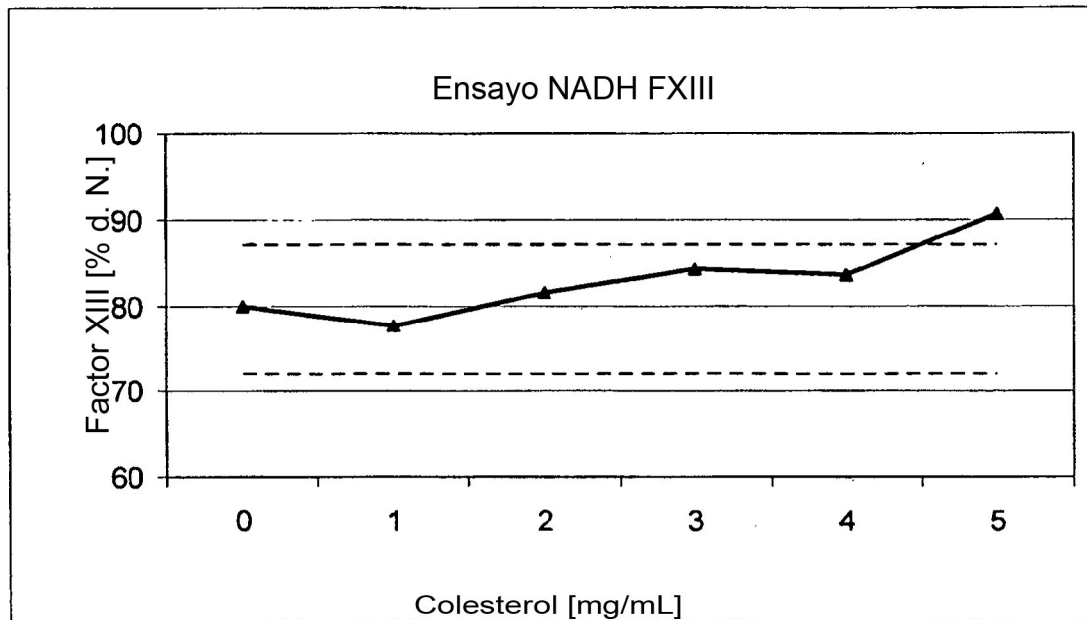


Figura 4

