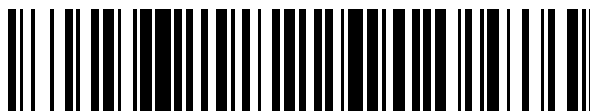


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 011**

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: **27.10.2007 E 07819390 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2079849**

54 Título: **Procedimiento y dispositivos para la determinación electroquímica de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre**

30 Prioridad:

**31.10.2006 EP 06123234**

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

**21.02.2014**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
GRENZACHERSTRASSE 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**HORN, CARINA;  
DOERGE, LIESEL y  
GALM, MARGARETE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 444 011 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivos para la determinación electroquímica de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre

5

Sector de la invención:

La invención se refiere a un procedimiento para la determinación electroquímica de inhibidores de factor Xa, en especial, de heparinas y derivados de heparina, así como inhibidores directos de factor Xa en muestras de sangre.

10

Además, la invención se refiere a elementos de prueba basados en química seca y a sistemas de análisis - elementos de prueba para la determinación electroquímica de inhibidores de factor Xa, en especial, de heparinas y derivados de heparina, así como inhibidores directos de factor Xa en muestras de sangre.

15 Estado de la técnica:

Para la profilaxis y terapia de alteraciones hemostáticas (alteraciones del sistema de coagulación), se utilizan frecuentemente en la práctica clínica, anticoagulantes, entre los que se cuentan también, en especial, las heparinas. La heparina y los derivados de la heparina se utilizan en especial para la terapia y profilaxis de enfermedades tromboembólicas. Son muy eficaces en la profilaxis y tratamiento de trombosis de vena de las piernas, embolias pulmonares y para el tratamiento de angina de pecho inestable, así como infarto de miocardio agudo. Se utilizan también en múltiples casos, durante operaciones, en especial en actuaciones cardiológicas (Bypass) y en transfusiones sanguíneas.

20

El efecto de las heparinas se basa en especial en su interacción con antitrombina III (ATIII), mediante la cual producen una variación de la conformación de la ATIII. De esta manera, se acelera la inactivación de determinadas enzimas de la coagulación (trombina (FIIa), factor Xa (FXa) y factor IXa), y de esta manera retrasa la coagulación. Las heparinas pueden ser, por lo tanto clasificadas en la clase de inhibidores de factor Xa. Otros inhibidores de factor Xa son, por ejemplo, determinados oligosacáridos tales como el pentasacárido Fondaparinux, o bien inhibidores directos de factor Xa de bajo peso molecular que se encuentran todavía en desarrollo clínico, que se pueden asociar a diferentes tipos de sustancias. Además de las heparinas no fraccionadas utilizadas desde hace mucho tiempo (UFH = heparina no fraccionada), desde el final de los años 1980 se utilizan también diferentes heparinas fraccionadas o heparinas de bajo peso molecular (=LMWH). Las heparinas fraccionadas sustituyen en el momento actual, para muchas indicaciones, la UFH, y se fabrican mediante despolimerización química o enzimática, partiendo de heparinas no fraccionadas, de manera que se generan fragmentos que tienen solamente, de manera aproximada, 1/3 de la magnitud de la heparina estándar. Para ello, se debilita, entre otras medidas, el efecto de estas LMWH sobre la trombina, mientras que se favorece la inactivación de factor Xa. Las heparinas fraccionadas presentan, a causa de su farmacocinética ventajosa, otras ventajas con respecto a las heparinas no fraccionadas convencionales. Un resumen de estos tipos de sustancias con respecto a su efecto clínico y significación, se puede encontrar en la obra "Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin (Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety)", Hirsh et al.; Chest 2001; 119: 64S-94S.

25

30

35

40

Para pacientes a los que se administrará heparina no fraccionada, se prescribe un control a causa de la variabilidad individual de la biodisponibilidad de la unión de proteína y un tiempo de vida media reducido de 30-150 minutos, para evitar una eventual sobredosificación con una mayor tendencia al sangrado, o bien una subdosificación con un mayor riesgo de trombosis. El control de la terapia con UFH tiene lugar en la rutina clínica de manera más frecuente en el tiempo de activación parcial de tromboplastina (aPTT), pero también mediante el tiempo de coagulación de la trombina (TCT) o el tiempo de coagulación activada (ACT). Estos análisis son los llamados análisis globales, puesto que reflejan de manera no específica la constitución de un coágulo de fibrina inducido por trombina. La prueba aPTT, que entre otros determina la actividad de los factores del sistema intrínseco, es especialmente sensible a los efectos inhibidores de la heparina sobre trombina. La prueba aPTT es sensible para el rango de heparina de 0,1-0,7 U/ml de manera que, no obstante, tanto el rango normal de la aPTT como también su rango terapéutico, dependen muy fuertemente del reactivo y del dispositivo de análisis utilizado. Otro factor limitativo es la estabilidad de la muestra, que frecuentemente conduce a resultados falseados después de un largo periodo de tiempo de espera de la muestra sanguínea. Otros inconvenientes de estos análisis globales de la coagulación son, entre otros, la realización frecuentemente compleja de la prueba, que requiere personal especialmente entrenado para conseguir resultados reproducibles y, asimismo, la relativamente elevada utilización de reactivos de esta prueba.

45

50

55

A causa de la mejor farmacocinética, el control de la administración de heparinas de bajo peso molecular en pacientes normales, no es crítico. La comprobación de la terapia se recomienda, no obstante, al inicio del tratamiento, y es necesaria en especial en pacientes con insuficiencia renal a causa de su eliminación renal alterada, recomendándose también en pacientes con peso corporal extremo, recién nacidos, niños, embarazadas, o para utilización durante varias semanas o bien después de trauma o de operaciones recientes.

60

En la rutina clínica, se utiliza para el control de LMWH sobre todo la utilización de aPTT, aunque esta prueba es poco sensible para este anticoagulante y además depende de manera muy marcada del reactivo de determinación utilizado.

5 Una prueba apropiada para el control del efecto de heparinas de bajo peso molecular es una prueba de FXa.

Las pruebas de FXa llevadas a cabo hasta el momento se han realizado principalmente como Pruebas Cromogénicas o Pruebas de Coagulación, midiendo la actividad de factor Xa en la prueba Cromogénica y la coagulación en la Prueba de Coagulación. Ambos principios de prueba siguen el mismo desarrollo de la prueba:

- 10
1. FXa + [Heparina/Antitrombina III] → [FXa/Heparina/ATIII]-Complejo + FXa restante
  - 2.
  - 15 a) FXa restante disociado de sustrato específico de FXa de un residuo cromógeno (Prueba de Cromógeno).
  - b) FXa restante disocia protrombina en trombina (Prueba de Coagulación de reticulación de fibrina inducida por trombina).

20 En la administración de la muestra se une en una cantidad definida en el reactivo de prueba, el factor Xa existente con la heparina contenida en la muestra y antitrombina III y constituye con estos un complejo inactivado. El factor Xa restante disocia o bien el sustrato cromógeno o bien forma trombina con los factores de coagulación contenidos en la muestra, que disocia el fibrinógeno en fibrina (constitución de coágulo). Según la actividad de factor Xa, se disocia una cantidad mayor o menor del sustrato. La actividad de factor Xa es nuevamente dependiente de la cantidad de heparina contenida en la muestra. Si bien las pruebas de cromógeno son específicas para la actividad de FXa de la muestra, las pruebas de coagulación no miden exclusivamente la actividad de FXa, siendo, no obstante, frecuentemente más sensibles para LMWH que la aPTT.

30 Comercialmente, se tienen a disposición más pruebas de cromógeno, pero solamente pocas pruebas de coagulación (Heptest de la firma Sigma, ENOX-Test de la firma Pharmanetics). Las diferentes pruebas se correlacionan entre sí y con respecto a aPTT solamente de forma moderada, puesto que tienen diferentes puntos finales. Las pruebas de cromógeno facilitan actividades, no tiempos de coagulación. La correlación entre tiempo de coagulación y actividad de factor Xa es, no obstante, solamente moderada. Además, estas pruebas de cromógeno requieren una separación del plasma y, por lo tanto, no pueden ser utilizadas directamente en muestras de sangre completa. Estos procedimientos de determinación requieren, por las dificultosas etapas de preparación de la muestra y etapas de realización, así como los dispositivos necesarios, una elevada inversión de tiempo, de personal y de aparatos. La Heptest facilita como resultado ciertamente un tiempo de coagulación, pero este puede resultar muy diferente a causa de la diferente sensibilidad a la heparina de los pacientes para igual concentración de heparina. Además, se hace necesaria la determinación de una curva de calibración de la que se puedan leer los resultados de la prueba. Como prueba de química seca, y por lo tanto también para aparatos de punto de cuidados apropiados, solamente existe una prueba disponible para factor Xa (ENOX-Test de la firma Pharmanetics), que es realizada con una tarjeta de pruebas en el "Rapid Point Analyzer" ("Analizador Rápido de Punto") de la firma Bayer. Esta prueba ha sido desarrollada especialmente para la utilización de Enoxaparina en angioplastia transluminal percutánea, y diferencia solamente entre concentraciones de exoparina > 1 U/ml y <1 U/ml y por lo tanto, no es apropiada para el control rutinario de la heparina de bajo peso molecular, puesto que, en especial, otras heparinas fraccionadas y heparina no fraccionada alteran la prueba.

45 El documento WO 92/07954 describe un procedimiento y dispositivos para una prueba de química en húmedo para la determinación de concentraciones de anticoagulantes en muestras líquidas diluidas, en las que la muestra líquida diluida recibe sucesivamente la añadidura de un factor de coagulación (por ejemplo, factor X), un reactivo activador, y un reactivo de detección, que es un sustrato de trombina.

50 El documento WO 03/050298 describe el principio de esta prueba de FXa por química seca del modo siguiente: la muestra a investigar, preferentemente sangre completa citrificada es mezclada con un reactivo de química seca que contiene, como mínimo, un activador de factor Xa, preferentemente Russels Viper Venom (veneno de víbora Russels), así como partículas magnéticas distribuidas de forma homogénea. Mediante el activador de factor Xa contenido en el reactivo, se transforma el factor X contenido en la muestra en factor Xa, que, por su parte, con intermedio de la conversión protrombina-trombina, produce la transformación de fibrinógeno en fibrina y, por lo tanto, la constitución del coágulo. La detección de este coágulo tiene lugar mediante procedimientos ópticos por observación de la motilidad de las partículas magnéticas en el medio de reacción, que se produce mediante un campo magnético oscilante externo. Este principio de prueba se refiere, por lo tanto, a la constitución de un coágulo de fibrina que, solamente en el curso de la reacción de detección, constituye mediante factor Xa, una cascada de reacción en la que participan además de factor Xa, otras enzimas y cofactores. Por esta razón, requiere, por ejemplo, la polimerización y reticulación de la fibrina, la presencia de iones calcio y factor XIIIa activado, el cual es formado nuevamente por una activación dependiente de trombina a base de factor XIII inactivo. La determinación de factor Xa mediante la determinación de la coagulación de trombina depende, por lo tanto, de otros factores esenciales y eventualmente efectos alterantes. Además de estos procedimientos de determinación indirectos, el procedimiento de determinación mostrado en el documento WO 03/050298, requiere un complejo sistema de

5 detección y evaluación para la determinación de factor Xa. Así por ejemplo, por una parte, el soporte de la prueba sobre el que tiene lugar la reacción de coagulación, debe presentar dispositivos especiales que garanticen una satisfactoria y homogénea mezcla de los reactivos y partículas magnéticas con la muestra y, por otra parte, el sistema de evaluación para la determinación de la actividad de factor Xa debe presentar dispositivos para la generación de un campo magnético oscilante, por ejemplo, mediante imanes permanentes móviles, y sistemas ópticos para la iluminación y detección fotométrica del desplazamiento de las partículas magnéticas.

10 El documento WO 01/63271 describe de modo general sensores electroquímicos sobre base de química seca para la determinación de la coagulación de la sangre o factores de coagulación individuales, presentando sobre un soporte inerte, como mínimo, 2 electrodos, así como un reactivo seco que contiene un sustrato de proteasa, que comprende un residuo peptídico que puede ser disociado por una proteasa del sistema de coagulación de la sangre y que está unido a través del extremo carboxílico de forma amídica a aminas sustituidas, especialmente a un residuo de fenilendiamina. Estas aminas sustituidas actúan en la disociación inducida por proteasa como elementos de transferencia de electrones de segundo tipo, y se puede recurrir a ellos para la determinación electroquímica de la actividad de proteasas. El documento WO 01/63271 describe además de las llamadas pruebas globales tales como aPTT, PT o ACT, en las que se determina el tiempo de coagulación con respecto a la actividad de la proteasa trombina, asimismo, pruebas con las que se pueden determinar factores individuales de coagulación o también sus inhibidores. A este respecto, el documento WO 01/63271 muestra la utilización de sustratos diseñados de forma especial para el factor de coagulación a determinar, cuya parte de péptido se ha adecuado especialmente a la proteasa a determinar, de manera que de esta proteasa se pueden disociar específicamente y la amina sustituida refleja nuevamente como fracción detectable electroquímicamente la actividad de dicha proteasa. Trasladado a una prueba de factor Xa, ello significaría la utilización de un sustrato de proteasa que está constituido por un residuo peptídico que puede ser disociado de factor Xa, y que está unido a través del extremo carboxílico de forma amídica en la amina sustituida, en especial, en un residuo de fenilendiamina. En este caso, se asemeja el principio de prueba a las pruebas cromogénicas de factor Xa, en las que igualmente se utiliza un producto de disociación enzimática de un sustrato específico de factor Xa para la determinación de factor Xa.

#### Objetivo de la invención:

30 Es objetivo de la presente invención dar a conocer un procedimiento y dispositivos para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre, que evitan los inconvenientes del estado de la técnica.

35 En especial, es objetivo de la presente invención dar a conocer procedimientos para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre, que pueden ser llevadas a cabo de manera simple y con reducida necesidad de tiempo, de aparatos o de personal, incluso por parte de personas no especialmente formadas, conduciendo en poco tiempo a resultados fiables.

40 En especial, es un objetivo de la presente invención, dar a conocer un procedimiento fácil de llevar a cabo para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre, en el que sea suficiente un número lo más reducido posible de etapas de procedimiento y de reactivos necesarios y/o aparatos, de manera que resulta posible una analítica descentralizada rápida, por ejemplo, directamente en lugares de cuidados intensivos o enfermerías.

45 Es un objetivo de la presente invención, en especial, dar a conocer procedimientos y dispositivos para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre que posibiliten también la determinación directamente con sangre entera y que no requieran etapas complicadas de preparación de la muestra.

50 Es un objetivo de la presente invención, en especial, dar a conocer procedimientos y dispositivos para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre, en los que sean suficientes las exigencias de almacenamiento y estabilidad de los reactivos y que posibiliten una determinación lo más exacta y posible que sea posible.

55 Es un objetivo de la presente invención, en especial, dar a conocer procedimientos y dispositivos para la determinación de heparinas, en particular, heparinas fraccionadas o heparinas de bajo peso molecular, así como inhibidores directos de factor Xa en muestras de sangre.

#### Solución según la invención:

60 La presente invención facilita la solución de estos objetivos mediante procedimientos, elementos de prueba electroquímicos y sistemas de análisis de elementos de pruebas para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre, tal como se indica en las reivindicaciones independientes. Se indican formas de realización preferentes en las reivindicaciones dependientes.

65 En especial, la presente invención describe para la solución de dichos objetivos, procedimientos para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre que se caracterizan porque, en una primera etapa, una muestra de la sangre a investigar se lleva a establecer contacto con un reactivo de detección, el cual contiene, como mínimo, un sustrato de trombina, el cual consiste en un residuo peptídico, que se puede disociar mediante

trombina, y que está unido mediante el extremo de carboxilo amídicamente a una sustancia electrogénica y con una cantidad conocida de factor Xa, en una segunda etapa, se determina a continuación la cantidad o actividad de la sustancia electrogénica, que es disociada mediante la activación de trombina provocada por el factor Xa del sustrato de trombina y/o cuyo comportamiento temporal como señal de medición es determinada con procedimientos electroquímicos y, finalmente, en una tercera etapa, en base a esta señal de medición, se determina la cantidad del inhibidor de factor Xa en la muestra de sangre a investigar o una magnitud correlacionada con la misma, en especial, el tiempo de coagulación correlacionado.

De acuerdo con la invención, la cantidad conocida de factor Xa en la primera etapa del procedimiento, no se añade directamente como reactivo de factor Xa, sino que tiene lugar mediante suministro de un reactivo que contiene una cantidad conocida de factor X (reactivo de factor X) y un reactivo activador, que provoca la conversión de factor X en factor Xa, a la muestra en una etapa común.

El procedimiento, según la invención, se explicará más detalladamente en base a una realización a título de ejemplo.

El principio de prueba se basa en la determinación de la actividad enzimática de la trombina constituida por la reacción de coagulación inducida por el factor Xa mediante una medición electroquímica, de manera que se determina, como mínimo, un producto de disociación de forma electroquímica en los electrodos. Como sustrato específico de trombina se puede utilizar en especial un sustrato de tripéptido, tal como, por ejemplo, cromozima TH reducida (acetato de Tosil-glicil-prolil-arginina-4-nitranilida), que se ha unido con intermedio del extremo carboxílico de la parte tripeptídica de forma amídica con una sustancia electrogénica. Estas sustancias electrogénicas se describen, por ejemplo, en el documento WO 01/63271 y pueden estar constituidas, en especial por anilinas sustituidas, en especial, derivados de la nitroanilina, o fenilendiamina. La reacción de detección tiene lugar de la forma siguiente:

La enzima trombina disocia del sustrato una sustancia electrogénica, en el presente ejemplo, fenilendiamina que es oxidada en los electrodos a fenilendiamina. En una forma de realización preferente, tiene lugar en los electrodos simultáneamente con la oxidación de este producto de disociación, la reducción de una sustancia auxiliar, por ejemplo, de resazurina a resorufina, de manera que se puede medir una intensidad de corriente que se correlaciona con la cantidad de producto disociado. Por lo tanto, la resazurina es reducida en la reacción electroquímica presente como sustancia auxiliar en el cátodo, mientras que en el ánodo se oxida fenilendiamina. Para la medición electroquímica de la actividad de la trombina se utiliza preferentemente un sistema de dos electrodos, de manera que se escoge, por una parte, el potencial en el electrodo de trabajo en un valor tal que la fenilendiamina liberada de la trombina es oxidada y, por otra parte, se escoge en un valor tan pequeño, que no se reduce ningún grupo residual del tripéptido. La diferencia de potencial entre el cátodo (electrodo de trabajo) y el ánodo (contraelectrodo) se regula mediante un potenciómetro. Como diferencia de potencial adecuada, se puede escoger en la presente realización, por ejemplo, una diferencia de potencial de unos 550 mV para posibilitar solamente las reacciones deseadas en los electrodos.

Con respecto al procedimiento, según la invención, este principio de prueba electroquímico en una prueba de inhibidor de factor Xa se utilizará del modo siguiente:

En la carga de reacción se encuentra, a parte del reactivo de detección, una cantidad conocida de factor Xa, la cual se ha generado por la añadidura de una cantidad conocida de reactivo de factor X y un reactivo activador que provoca la conversión de factor X en factor Xa. La muestra de sangre a investigar contiene el inhibidor de Xa a determinar, el cual está constituido, preferentemente, por una heparina. Este forma con el factor Xa que se encuentra en la carga de reacción, y en cantidad conocida en exceso, así como la antitrombina III, que se encuentra en la muestra de sangre, un complejo estequiométrico. En este caso, queda disponible una cantidad residual de FXa, cuya concentración depende de la concentración del inhibidor de factor Xa en la muestra. Este puede reaccionar con la protrombina existente en la muestra de sangre (y con él, factor Va, asimismo existente) formando un complejo de protrombina y, finalmente, trombina, que tal como se ha descrito anteriormente, puede ser determinada por la disociación enzimática condicionada por la trombina de una sustancia electrogénica y su detección electroquímica.

Cuanto mayor es la cantidad de inhibidor de factor Xa en la muestra, más reducida es la cantidad residual de FXa, después de la formación del complejo con el ATIII restante y, por lo tanto, menor es la cantidad de trombina formada. El presente principio de medición no detecta tiempo de coagulación en el sentido estricto, es decir, no se trata propiamente de una prueba de coagulación con la constitución de fibrina, sino de una determinación del transcurso de tiempo de la constitución de la trombina con procedimientos electroquímicos.

El ejemplo 2 y la figura 1 muestran a título de ejemplo el resultado de una determinación electroquímica de trombina de este tipo, que corresponde al procedimiento de la invención.

La utilización, según la invención, de factor Xa activado con un reactivo de detección de trombina presente, en comparación con las pruebas cromogénicas de factor Xa y el procedimiento descrito en el documento WO 01/63271, una fuerza afirmativa más elevada con respecto al estado fisiológico del sistema de coagulación, puesto que en

este caso, no es disociado ningún sustrato artificial específico de factor Xa, y además se mide la actividad de factor Xa sino que, tal como en la coagulación fisiológica, se constituye trombina en primer lugar. Esta constitución de trombina, puede ser determinada, según la invención, electroquímicamente mediante un sustrato específico de trombina, y puede ser transformada con un algoritmo apropiado, por ejemplo, en tiempo de coagulación. Al contrario que en las pruebas de inhibidores de factor Xa que se basan en la prueba de heparina ("Heptest") o la prueba ENOX sobre la determinación de la constitución inducida por FXa de un coágulo de fibrina, la invención tiene la ventaja de que la determinación con procedimientos electroquímicos es sustancialmente más simple y puede ser llevada a cabo con menor complicación en cuanto a personal y a los aparatos utilizados. Por esta razón, dado que la actividad de factor Xa es determinada con el procedimiento de la invención por la actividad del primer factor de coagulación involucrado en la cascada de coagulación fisiológica, que se produce de modo natural (trombina), por una parte, la actividad fisiológica del inhibidor de factor Xa será determinada de manera más próxima al sistema natural que en las pruebas cromogénicas y el procedimiento descrito en el documento WO 01/63271 que trabajan con sustratos de factor Xa no fisiológicos y, por otra parte, la detección de la actividad de FXa se determinará en un punto más próximo de la cascada de coagulación que en las pruebas que se basan en la determinación de la constitución de un coágulo de fibrina inducido por FXa, por lo que los factores de coagulación que se encuentra entre la constitución de la trombina y la constitución del coágulo de fibrina, no tienen influencia en la determinación de la actividad de factor Xa. Por esta razón, las afirmaciones de la actividad de factor Xa en el sistema fisiológico, son posibles de forma más exacta y específica que con las pruebas conocidas hasta el momento.

Mediante la solución según la invención, se hace posible incluso llevar a cabo en sangre completa, la determinación del inhibidor de factor Xa, puesto que a diferencia de lo que ocurre en los procedimientos de medición cromogénicos, no es necesaria una engorrosa separación, en especial por coloración de los componentes de la sangre en los procedimientos electroquímicos utilizados. Mediante el control de los electrodos, adecuado a las sustancias electrogénicas utilizadas en la detección, por ejemplo, mediante la elección adecuada del potencial de los electrodos, se pueden detectar las sustancias electrogénicas utilizadas para la detección sin influencia de otras sustancias existentes en la muestra o en los reactivos que son potencialmente perturbadoras.

Para la determinación de un inhibidor de factor Xa, se deben añadir a la muestra a investigar, de acuerdo con la siguiente invención, como mínimo, las siguientes sustancias: una cantidad conocida de factor X, un reactivo activador, y un sustrato de trombina peptídico como reactivo de detección, del cual se pueda disociar enzimáticamente una sustancia electrogénica. La añadidura de las cantidades conocidas de factor X y del reactivo activador, tienen lugar en una única etapa. Muchos de los sustratos de trombina, conocidos y utilizados en pruebas de trombina, entre ellos también la ampliamente utilizada cromozima TH, no presentan, no obstante, una especificidad absoluta y exclusiva para la trombina, sino que pueden también ser disociados por otras enzimas.

El factor de coagulación Xa es una proteasa de serina que reconoce de manera natural la secuencia de aminoácidos – Ile-Glu-Gli-Arg de la protrombina, y por disociación activa en esta secuencia, la protrombina natural del sustrato a protrombina. Además, este sustrato fisiológico, el factor Xa tiene también la capacidad de disociar también otros péptidos con estas u otras secuencias de disociación de forma enzimática. Así, por ejemplo, se pueden disociar también de forma sustratos peptídicos de trombina, en especial, la ampliamente utilizada cromozima TH de factor Xa. Mediante esta reducida especificidad del sustrato de factor Xa, se pueden presentar, en el procedimiento objeto de la invención, en especial, problemas cuando un sustrato de trombina de este tipo, disociable de factor Xa, es utilizado como reactivo de detección, y éste antes de la añadidura de la muestra establece contacto con factor Xa, pudiendo ser transformado por éste. De este modo, se puede transformar una parte del sustrato de trombina, de manera que este ya no se encuentra a disposición para la reacción de detección provocada por la trombina, y por lo tanto, influye en el resultado de la medición. Estas reacciones secundarias no deseadas se pueden presentar especialmente cuando el factor Xa y el sustrato de trombina están en contacto durante un tiempo prolongado, tal como ello ocurriría cuando se deseara llevar estas dos sustancias simultáneamente a un reactivo líquido de detección.

Referido al sistema de medición a título de ejemplo antes mencionado, esto significaría que en el caso en que el factor Xa y la cromozima TH reducida utilizada como sustrato de trombina pudieran reaccionar antes del inicio de la reacción de detección durante un periodo de tiempo prolongado, ya se disociaría una parte del sustrato de trombina y, por lo tanto, ya se encontraría una cantidad sustancialmente indefinida de la sustancia electrogénica disociada en la reacción. Estos casos pueden ocurrir en especial cuando ambas sustancias se encuentran conjuntamente en un reactivo fluido o en el caso de que en pruebas de química seca establecieran contacto entre sí durante su preparación en forma líquida. Por ello, puede ser suficiente un tiempo conjunto de permanencia de dos horas para disociar ya aproximadamente el 25% de la cromozima TH reducida solamente por el efecto de factor Xa. El resultado de esta eliminación del sustrato de forma anticipada, condicionada por el factor Xa, sería que en el procedimiento electroquímico objeto de la invención se presentaría que la señal de medición ya desde el inicio de la disociación de la cromozima TH reducida producida por trombina presentara un paso o desplazamiento a intensidades de corriente más elevadas, así como también intensidades de corriente elevadas en el mínimo, puesto que en la muestra existe ya por el efecto enzimático de la fenilendiamina liberada de factor Xa como sustancia electrogénica.

De acuerdo con la invención, la problemática de la eliminación del sustrato anticipada condicionada por el factor Xa se solucionará, por lo menos parcialmente, puesto que una cantidad conocida de factor Xa llegará a la carga de reacción por la añadidura de una cantidad conocida del reactivo de factor X y un reactivo activador que provocarán la transformación de factor X proteolíticamente inactivado en el factor Xa proteolíticamente activo.

5 De manera sorprendente, se ha demostrado mediante este procedimiento objeto de la invención, que mediante esta combinación de reactivos, es posible la constitución de un elemento de prueba simple y estable. Por el hecho de que en el reactivo, antes de la añadidura o bien de la activación de un reactivo activador, no existe factor Xa activado, sino factor X inactivado, es posible llevar a establecer contacto el reactivo de detección, ya antes del inicio de la  
10 reacción de determinación con el factor X sin que ello conduzca a una eliminación anticipada del sustrato determinado por el factor Xa, y por lo tanto, a influir en la determinación.

En formas de realización especialmente preferentes, se utilizará como reactivo activador un activador o un complejo asociado de la vía extrínseca de la coagulación plasmática. En particular, se pueden utilizar como reactivos  
15 activadores los activadores de tipo natural o factores de coagulación, tales como factor tisular y/o factor VIIa, de manera que a partir de estos activadores de tipo natural o factores de coagulación, también se pueden utilizar otros activadores producidos, por ejemplo, de forma sintética.

En otras formas de realización preferentes, se utilizará como reactivo activador un activador o un complejo  
20 relacionado de la vía intrínseca de la coagulación plasmática. Se pueden utilizar en especial como reactivos activadores los activadores de tipo natural o factores de coagulación, tal como factor XIIa o sustancias que producen una transformación de factor X en factor Xa, por ejemplo, el veneno de víbora Russels (RW-X), de manera que aparte de estos activadores de tipo natural, también se pueden utilizar otros activadores producidos, por ejemplo, de  
25 forma sintética.

El reactivo activador se añadirá en este caso como reactivo externo a la muestra o a los otros reactivos antes de la  
medición o en el transcurso de la misma. Otras sustancias necesarias para la realización de la activación de factor  
Xa o para la reacción de detección, se pueden añadir como reactivo externo a la muestra, o a los otros reactivos,  
antes o en el transcurso de la medición, o pueden estar ya contenidos en la muestra de sangre. Así, por ejemplo, se  
30 pueden preparar, por ejemplo, otros factores de coagulación necesarios, tales como factor V o antitrombina a través de la muestra de sangre a analizar.

Los reactivos de química seca se aplicarán principalmente sobre elementos de prueba, colocados en forma de una  
solución como tiras de aplicación sobre un elemento de prueba y de allí se retira el medio de solución, de manera  
35 que se encuentran en situación en forma de química seca. Esto es especialmente ventajoso puesto que los reactivos en forma seca cumplen exigencias sustancialmente más elevadas con respecto al mantenimiento y a la estabilidad que reactivos de química húmeda. La transferencia a la forma de solución más activa pero también más inestable tiene lugar en el momento de tiempo determinado mediante la nueva solución de los reactivos de química  
40 seca mediante alimentación de fluido, preferentemente mediante solución directa en la muestra de sangre a analizar.

De acuerdo con la invención, la añadidura de reactivos de factor X a la muestra tiene lugar en una fase conjunta con  
la añadidura del reactivo activador a la muestra.

En reacciones de química húmeda, esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, de forma que ambos reactivos son  
añadidos conjuntamente desde sus compartimientos correspondientes de almacenamiento (recipientes de  
almacenamiento) a la muestra, por ejemplo, mediante bombas o pipetas. No obstante, es también posible que se  
añadan el reactivo de factor X y el reactivo activador en primer lugar, y esta mezcla de reactivos, en la que se  
45 genera factor Xa, se facilita a continuación a la muestra.

En una forma de realización según la invención, el reactivo de factor X y el reactivo activador se encuentran  
conjuntamente en situación seca, y la transformación de factor X en factor Xa tiene lugar solamente después del  
50 contacto con la muestra.

Mediante la utilización de reactivos de química seca, es posible almacenar esta conjuntamente de forma inactiva, sin  
que tenga lugar reacción química entre los reactivos. Solamente después del humedecimiento de los reactivos de  
química seca, serán llevados estos a una situación en la que pueden reaccionar entre sí. Esta "activación" de los  
reactivos de química seca se lleva a cabo de manera automática en una forma de realización preferente mediante la  
55 muestra líquida de sangre.

En una forma de realización especialmente preferente, el reactivo de factor X, el reactivo activador y el reactivo de  
detección, se encuentran conjuntamente en forma de reactivos de química seca y la transformación de factor X en  
factor Xa es provocada solamente después del contacto con la muestra.

Puesto que es posible por la utilización de reactivos de química seca el almacenar estos conjuntamente en forma  
inactivada sin que tenga lugar la reacción química entre los reactivos, mediante el procedimiento y dispositivo según  
65 la presente invención, se pueden almacenar todos los reactivos necesarios para la determinación de los inhibidores

de factor Xa en un compartimiento conjunto sin que se produzca una eliminación del sustrato de trombina anticipada provocada por el factor Xa. Solamente por la añadidura de la muestra líquida, tiene lugar la transformación de factor X en factor Xa con un punto inicial básicamente definido y un transcurso temporal, asimismo definido, de manera que finalmente se encuentra una cantidad conocida de factor X en la muestra, que constituye la base de la determinación de los inhibidores de factor Xa de acuerdo con el principio de la invención.

De este modo, se pueden disponer en principio los reactivos necesarios para la determinación de inhibidores de factor Xa según procedimientos conocidos por los técnicos, en una única tira de reactivos de química seca o de tipo puntual, lo que puede posibilitar una producción económica y simple y menores errores de manipulación.

Los procedimientos y dispositivos según la invención, para la determinación de inhibidores de factor Xa se pueden utilizar de manera especialmente ventajosa para la determinación de heparinas, en especial, heparinas fraccionadas o de bajo peso molecular. Otros inhibidores de factor Xa que se pueden determinar ventajosamente con los procedimientos y dispositivos de la invención, pueden estar constituidos especialmente por inhibidores indirectos selectivos o directos de factores Xa.

Como inhibidores de factor Xa en el sentido de la invención, se pueden considerar todas aquellas sustancias que influyen de manera directa o indirecta en la actividad de factor Xa, en especial que reducen, y por lo tanto influyen, en la realización de la cascada de coagulación de la sangre, retrasándola de manera específica. Los inhibidores de factor Xa directos, actúan directamente sobre el factor Xa e influyen, por lo tanto, en su actividad, mientras que los inhibidores indirectos de factor Xa no actúan directamente con el factor Xa, sino que influyen en su cantidad y constitución, o bien necesitan un cofactor para su activación. Estos pueden ser, por ejemplo, anticoagulantes que actúan sobre los factores de coagulación, que intervienen en la cascada de coagulación de factor Xa y que soportan su formación y/o regulación. Son ejemplos de inhibidores selectivos indirectos de factor Xa determinados pentasacáridos, tales como Fondaparinux e Idraparinux, que funcionan en combinación con antitrombina III y, a diferencia de la heparina, son selectivos para el factor Xa. Son ejemplos para inhibidores directos de factor Xa, el Otamixaban o Razaxaban.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a elementos de pruebas con un sensor electroquímico sobre base de química seca para la determinación de inhibidores Xa, en especial, heparinas no fraccionadas, heparinas fraccionadas o de bajo peso molecular, inhibidores indirectos selectivos de factor Xa o inhibidores directos de factor Xa que presentan sobre un soporte inerte, como mínimo, dos electrodos y un reactivo de detección, el cual consiste, como mínimo, en un sustrato de trombina que está constituido por un residuo peptídico que puede ser disociado por trombina y que está unido mediante el extremo carboxílico de forma amídica a una sustancia electrogénica, y que contiene, como mínimo, una cantidad determinada de reactivo de factor X y un reactivo activador.

Estos elementos de prueba, según la invención, son especialmente apropiados para la realización de los procedimientos descritos de acuerdo con la invención para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre.

Los elementos de pruebas, según la invención, son elementos de pruebas electroquímicos en base a química seca. Estos elementos de pruebas contienen, como mínimo, dos electrodos, de los que, como mínimo, un electrodo, es llamado electrodo de trabajo. No contienen de manera necesaria un electrodo clásico de referencia, tal como por ejemplo, un electrodo de referencia Ag/AgCl, sino solamente, como mínimo, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo. Los electrodos pueden estar construidos en todos los materiales de electrodos habituales, por ejemplo, metales, metales nobles, aleaciones o grafito, preferentemente metales nobles tales como oro o paladio o bien grafito. Los diferentes electrodos de los elementos de pruebas pueden consistir en materiales iguales o diferentes. En una forma de realización preferente, el elemento de prueba contiene un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, que están realizados ambos en oro.

Las disposiciones concretas de estos elementos de prueba electroquímicos, en especial con respecto a la elección de los materiales, disposición de los electrodos y reactivos, así como fabricación de los elementos de pruebas, se conocen por el estado de la técnica, por ejemplo, por los documentos US 5762770, US 6270637 o WO 01/63271 en los que se describen y son conocidos por los expertos.

Los reactivos son aplicados en formas de realización preferentes en forma de una o varias tiras de reactivos sobre los electrodos. Pueden recubrir a éstos de manera parcial o completa. Además, es posible según la invención, aplicar los reactivos no directamente sobre los electrodos, sino en las proximidades de los electrodos, por ejemplo, cerca de los electrodos sobre un sustrato superficial, procediendo a su secado. En este caso, los reactivos son transportados con la muestra durante la medición hacia los electrodos. De manera alternativa, es también posible disponer los reactivos por impregnación en materiales porosos tal como, por ejemplo, fieltro, papel, membranas y similares por ejemplo, para formar una solución. Estos materiales deben ser, por lo tanto, arrastrados de la muestra antes del contacto con los electrodos, y de esta forma se pueden facilitar los reactivos a la muestra. También es posible disponer los componentes individuales de los reactivos en compartimientos distintos del elemento de prueba, por ejemplo, el reactivo de detección sobre o cerca de los electrodos, el reactivo de factor X conjuntamente con un



reactivo activador, pero separado espacialmente del mismo, (por ejemplo, más alejados de los electrodos) o en capas diferentes (por ejemplo, membranas o fieltro) por impregnación.

De acuerdo con la invención, el elemento de prueba contiene reactivo de factor X y reactivo activador en forma de química seca, los cuales provocan la transformación de factor X en factor Xa, de manera que el reactivo activador es aplicado sobre el elemento de prueba conjuntamente con el reactivo de factor X, opcionalmente de forma conjunta con el reactivo de detección, y de manera que la transformación de factor X a factor Xa es realizada solamente por el contacto con la muestra. De esta manera, dado que el reactivo de factor X y el reactivo aplicador se encuentran en forma de química seca sobre el elemento de prueba, se encuentran estos en una forma en la que no pueden reaccionar entre sí. De este modo, el reactivo de factor X y el reactivo activo pueden ser depositados conjuntamente en un compartimiento, sin que se forme factor Xa. Solamente por la añadidura de líquido, en especial por el contacto con el líquido de la muestra, pueden reaccionar ambos reactivos entre sí y ello se puede traducir en la transformación de factor X en factor Xa.

En una forma de realización preferente, ello se consigue, por ejemplo, de manera que el reactivo de factor X y el reactivo activador son dispuestos en forma de una tira conjunta de reactivo sobre el elemento de prueba. El reactivo de detección puede encontrarse en esta forma de realización en otro compartimiento, en especial, otra tira de reactivo, la cual puede encontrarse de todos modos, en contacto como mínimo parcial, con la tira de reactivos del reactivo activador/factor X combinado.

En una forma de realización especialmente preferente se puede añadir también el reactivo de detección al reactivo de factor X y al reactivo activador, de manera que todos los reactivos necesarios para la determinación de factor Xa se encuentren en un compartimiento único, especialmente en una única tira de reactivo sobre el elemento de prueba. Tal como se ha explicado anteriormente, es posible por la utilización de reactivos de química seca colocar el reactivo de factor X y el reactivo del activador conjuntamente en un compartimiento sin que se forme factor Xa. De esta manera, es posible facilitar también el reactivo de detección a esta combinación de reactivos, puesto que sin factor Xa activado tampoco puede tener lugar ninguna eliminación del reactivo de detección condicionado por el factor Xa de forma anticipada. En especial, es posible mediante esta solución de la invención disponer todos los reactivos necesarios para la determinación de inhibidores de factor Xa en un compartimiento único de manera que resulta posible conseguir construcciones de elementos de pruebas más simples y económicos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a sistemas de análisis del elemento de pruebas de tipo electroquímico, los cuales contienen, como mínimo, un elemento de pruebas según las reivindicaciones y un aparato de medición de la corriente o de la tensión eléctrica. Mediante la utilización de estos aparatos de medición, se puede captar mediante la corriente que aparece entre los electrodos, los productos electrogénicos del sustrato de trombina-productos de disociación que aparecen en el transcurso de la determinación del inhibidor de factor Xa, especialmente fenilendiamina. En formas de realización especialmente preferentes, se captará la variación de la corriente a lo largo del tiempo. La determinación electroquímica tiene lugar preferentemente de forma casi potencioestática, preferentemente con un sistema de 2 electrodos en el que un electrodo es conectado simultáneamente como electrodo de referencia y contraelectrodo, y el otro electrodo es conectado como electrodo de trabajo. En este sistema de 2 electrodos, se aplica una tensión constante y se mide la corriente a lo largo del tiempo. Este procedimiento se designa también como procedimiento de medida amperométrico. En este caso, se capta el desarrollo temporal de la corriente y se determina después de qué periodo de tiempo desde el inicio de la reacción de determinación, la corriente medida supera un valor de umbral predeterminado. Este periodo de tiempo es una medida de la transformación del sustrato de trombina condicionada por el factor Xa en el transcurso de la reacción de coagulación, la cual a su vez depende de la cantidad de inhibidor de factor Xa existente en la muestra.

Además del procedimiento de medición amperométrico que se ha descrito, se pueden utilizar también procedimientos de medición voltamétricos. En este caso, no se regula una tensión constante entre los electrodos, sino que la tensión varía de forma lineal desde un valor inicial a un valor final y se conduce, a continuación, nuevamente en retorno al valor inicial. Este proceso puede ser repetido varias veces durante el mismo periodo de medición. En el procedimiento voltamétrico, se marca la corriente con respecto a la tensión y se consiguen de forma correspondiente a las repeticiones curvas de corriente-tensión (ciclovoltamograma) encadenadas entre sí. Para una zona de tensión apropiada, se forman en estas curvas picos de oxidación y picos de reducción del transportador de electrones. La altura de estos picos es directamente proporcional a la concentración del transportador de electrones siempre que no se oxiden o reduzcan otras sustancias adicionales redoxativas en la zona de potencial de superposición, facilitando de esta manera una corriente adicional. En la medición de la variación de concentración, se puede despreciar opcionalmente, esta alteración. En caso de que se representen los valores de la corriente de los máximos de los picos o de las superficies inscritas por las curvas (que corresponden a la transformación de la carga) de los bucles individuales corriente-tensión a lo largo del tiempo se obtiene de manera correspondiente una representación de la variación de concentración del transportador de electrones a lo largo del periodo de medición en un determinado periodo de tiempo determinado por la duración del ciclo. Esta información se puede utilizar tal, como por ejemplo, en el procedimiento amperométrico, para la determinación del inhibidor de factor Xa. Estos procedimientos se describen, por ejemplo, en el documento WO 01/63271.

Los procedimientos y dispositivos, según la invención, pueden ser utilizados en especial para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre. En el sentido de la presente solicitud de patente, el concepto de muestra de sangre comprende no solamente sangre sin tratar (sangre entera), sino también derivados de la sangre o productos de la sangre que se pueden conseguir de muestras de sangre original mediante procesos bioquímicos y/o químicos y/o físicos. Como derivados de la sangre, se pueden considerar en el sentido de la presente solicitud de patente en especial, suero o plasma. Bajo el concepto de inhibidores de factores Xa se pueden considerar en el sentido de la presente solicitud de patente todos los inhibidores cualitativos, cuantitativos o semicuantitativos para la determinación de factor Xa.

10 Ejemplos de realización

La invención se explicará con mayor detalle a continuación en base de los ejemplos y representaciones a título de ejemplo. Los ejemplos que no contienen reactivo de factor X y reactivo activador en combinación, sirven a efectos comparativos.

15 La figura 1 muestra a título de ejemplo el resultado primario de la medición de una determinación de inhibidor de factor Xa por vía electroquímica correspondiente al procedimiento de la invención.  
La figura 2 muestra los resultados de una determinación de trombina por vía electroquímica en disposiciones distintas de las tiras de reactivo de un reactivo activador y una combinación de reactivo de detección/reactivo de factor X sobre un elemento de prueba.

Ejemplo 1: Formación, a título de ejemplo, de un elemento de prueba según la invención

Una posible realización de un elemento de prueba según la invención, así como su fabricación, se describirá a continuación a título de ejemplo.

El material inerte de soporte puede consistir, por ejemplo, en una lámina de poliéster, por ejemplo, una lámina de Melinex. Sobre ésta, se pueden colocar las diferentes estructuras para los diferentes procedimientos, por ejemplo, por vaporización de la lámina de soporte con oro y a continuación, ablación por láser de las estructuras de electrodos deseadas siendo posibles también, para el experto, otros procedimientos tales como, por ejemplo, procedimientos de ataque químico o procedimientos a presión para la fabricación de estas estructuras de electrodos. Opcionalmente, se pueden prever a continuación partes determinadas de las estructuras de electrodos con capas aislantes.

35 Sobre el material de soporte con sus estructuras de electrodos, se aplican a continuación los reactivos necesarios para la determinación. Esto puede tener lugar con diferentes procedimientos conocidos por los expertos, en especial procedimientos a presión o de rasquetado, en los que los reactivos son aplicados en forma disuelta como tiras de reactivo sobre el elemento de prueba, y a continuación, se elimina, por lo menos parcialmente, el medio de solución, de manera que los reactivos se encuentran sobre el elemento de pruebas en forma de química seca, es decir, en forma inactivada. Estos procedimientos se describen, por ejemplo, en el documento WO 01/63271.

Habitualmente, en dichos procedimientos de recubrimiento, los reactivos son disueltos en una composición de base que contiene sustancias que posibilitan una manipulación lo más óptima posible de la solución de reactivos.

45 Una composición a título de ejemplo de una preparación de base de este tipo es, por ejemplo (disuelta en Aqua bidest):

Concentración (dentro de paréntesis: rango posible de la invención)	Sustancia	Función de la sustancia	Proveedor
3,5 g/l (0-50 g/l)	Keltrol F	Formador de película	Roche Diagnostics GmbH
5 g/l (0-75 g/l)	Hidroxipropil-celulosa	Espesante	Hercules
1 g/l (0-10 g/l)	Mega 8	Detergente	Roche Diagnostics GmbH
20 g/l (0-200 g/l)	Mowiol	Formador de película	Kuraray
	Tampón básico		
120 mM (10 - 500 mM)	HEPES	Tampón de pH	Sigma

10 g/l (0,1-100 g/l)	RPLA 4 (Serabulmina)	Proteína de protección	Roche Diagnostics GmbH
30 g/l (0-200 g/l)	Glicina	Estabilizador, Mediator de solución	Roche Diagnostics GmbH
75 g/l (0-300 g/l)	Sacarosa	Estabilizador, Mediator de solución	Roche Diagnostics GmbH

A esta composición básica, se mezclarán a continuación de modo correspondiente los componentes reactivos específicos (por ejemplo, sustrato de trombina, factor X, reactivo activador; solos o también en combinación), y se definen espacialmente, por ejemplo, como tira de reactivos o de puntos, siendo aplicado sobre el elemento de prueba. Después de la eliminación del medio de solución, se dispone de tiras de reactivos definidas y estables, o bien puntos de reactivos, sobre el elemento de prueba, en los cuales se pueden almacenar durante un largo tiempo los reactivos de forma estable sin pérdida de actividad. En formas de realización preferentes, se colocan adicionalmente sobre el soporte de pruebas, separadores laterales y la lámina de recubrimiento, los cuales definen un canal capilar mediante el cual se puede extraer un volumen esencialmente definido de la muestra, siendo transportado a los compartimientos de reactivos y electrodos.

Ejemplo 2: Realización, a título de ejemplo, de una determinación de inhibidor de factor Xa por vía electroquímica de forma correspondiente a los procedimientos y dispositivos de la invención

En un elemento de pruebas según la invención, que se puede fabricar preferentemente según el ejemplo 1, se colocará para la realización de la determinación de inhibidor de factor Xa una cantidad suficiente, por ejemplo 1-1000 µl, preferentemente unos 10 µl de la sangre a analizar de forma tal que establezca contacto con los compartimientos de reactivos que se encuentran en el elemento de prueba. Esto puede tener lugar preferentemente mediante la existencia de un canal capilar en el elemento de prueba y el posicionamiento apropiado de los compartimientos de reactivo y electrodos sobre el elemento de prueba dentro de este canal capilar. En formas de realización preferentes, se pueden atemperar fluidos de muestra, elementos de prueba y/o otros dispositivos necesarios para la determinación del inhibidor de factor Xa a una temperatura determinada, en especial una temperatura de unos 37°C. El elemento de prueba será conectado para la captación de las reacciones de detección de tipo electroquímico a un aparato de medición apropiado, por ejemplo, un sistema Strommess, que puede determinar y almacenar en especial el desarrollo temporal del flujo de corriente.

La figura 1 muestra a título de ejemplo el desarrollo temporal de la determinación de inhibidor de factor Xa por vía electroquímica de manera correspondiente al procedimiento de la invención. En este caso se ha utilizado el elemento de prueba correspondiente al ejemplo 1.

La curva muestra el desarrollo temporal de las intensidades de corriente medidas, determinadas por la oxidación de la fenilendiamina después de esta disociación inducida por trombina del sustrato de trombina. Sobre el eje x se ha representado el tiempo t en segundos después de la aplicación de la prueba de sangre, en el eje y se ha representado la intensidad de la corriente y determinada en el correspondiente punto de tiempo en nanoamperios. La curva discurre en primer lugar en un mínimo, sube después al aumentar la oxidación de la fenilendiamina, llega finalmente a un máximo y disminuye entonces de manera continuada a causa del empobrecimiento del sustrato. La valoración de este transcurso temporal de la corriente para la determinación de magnitudes de medición temporales que representan el desarrollo de la reacción de detección, tiene lugar, por ejemplo, mediante un algoritmo de valor de umbral. Este algoritmo suma, al mínimo calculado, un valor de umbral, por ejemplo 60nA, que se mantendrá para todas las mediciones. Como magnitud temporal de medición para la conversión de la trombina, se puede determinar el tiempo después de alcanzar el mínimo, hasta que se alcanza dicho valor de umbral. Dado que las magnitudes temporales de tiempo determinadas de este modo para la conversión de trombina dependen de la actividad/concentración de factor Xa activado y este, a su vez, de la cantidad o concentración eventualmente de inhibidores de factor Xa, los valores temporales determinados de este modo, se puede llegar a la conclusión de la existencia de la superación o de que no se llega a una concentración determinada, o bien de la cantidad o concentración de un inhibidor de factor Xa. Para ello, se pueden formar, por ejemplo, curvas con muestras de concentración de inhibidor de factor Xa conocido, las cuales ponen en correlación estas concentraciones con los parámetros de tiempo determinados de acuerdo con la invención.

Además, de estas magnitudes de medición determinadas de manera temporal, se pueden determinar otras magnitudes de medición que se correlacionan con la cantidad de un inhibidor de factor Xa eventualmente existente, especialmente tiempos de coagulación con la utilización de algoritmos adecuados.

Ejemplo 3: Influencia de las disposiciones de las tiras de reactivos sobre el elemento de prueba que contiene un reactivo de factor X y un reactivo activador.

- 5 La figura 2 muestra los resultados de determinaciones de trombina por vía electroquímica para diferentes disposiciones de las tiras de reactivos de un reactivo activador y de una combinación de reactivo de determinación/reactivo de factor X sobre un elemento de prueba. Se muestra de manera correspondiente el desarrollo temporal de la intensidad de corriente medida, de manera que sobre el eje x se ha mostrado el tiempo t en segundos, después de la aplicación de la muestra de sangre, y sobre el eje y, la intensidad de corriente determinada en el correspondiente punto de tiempo en nanoamperios. En el presente ejemplo, la tira de reactivos de reactivo de
- 10 detección/reactivo de factor X contiene, 0,8 ml de cromozima TH reducida y 38,1 µl de factor X (factor X de la firma American Diagnostica; correspondientes a 2U/ml de factor Xa), la tira de reacción del reactivo activador 80 µl de veneno de víbora Russels (Russels Viper Venom (RVV-X) de la firma Pentapharm Ltd.) y 0,04% de fosfolípidos (PHL).
- 15 Las tiras de reactivos se aplicaron según las siguientes variantes:
- Curva A: en primer lugar, se aplicó la tira de reactivos de la combinación reactivo de detección/reactivo de factor X y sobre este, se aplicó a continuación, la tira de reactivo del reactivo activador.
- 20 Curva B: en primer lugar, se aplicó la tira de reactivo de la combinación reactivo de detección/reactivo de factor X, y sobre éstos, a continuación, la tira de reactivos del reactivo activador, de manera que la aplicación de la tira de reactivo de un reactivo activador tubo lugar de manera desplazada, de forma que ésta se superpone, por lo menos parcialmente, en la dirección del flujo de la muestra antes de la tira del reactivo de la combinación reactivo de detección/reactivo de factor X, y por lo menos parcialmente, recubre a ésta.
- 25 Ninguna de las curvas de la figura 2 muestra desplazamiento del mínimo hacia valores de corriente más altos, así como una reducida corriente de entrada. Esto significa que con este procedimiento preferente según la invención y su dispositivo, se puede impedir la eliminación anticipada de sustrato mediante la separación espacial, por lo menos parcial, de los reactivos en dos compartimientos, en especial tiras de reactivos, en su mayor parte.
- 30 Una aplicación desplazada de la tira de reactivo del reactivo activador (curva B) en la dirección del flujo de la muestra antes de la tira de reactivo de la combinación reactivo de detección/reactivo de factor X, muestra, al contrario que en la aplicación de la tira de reactivo del reactivo activador directamente sobre la tira de reactivo de la combinación reactivo de detección/reactivo de factor X (curva A) máximos de corriente más reducidos así como una cinética de reacción ralentizada. La aplicación de la tira de reactivo del reactivo activador directamente sobre la tira
- 35 del reactivo de la combinación reactivo de detección/reactivo de factor X, son especialmente ventajosas ante todo en base a las cinéticas de reacción rápidas para la determinación según la invención de inhibidores de factor Xa, en especial en utilizaciones de diagnóstico.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación de inhibidores de factor Xa en muestras de sangre, caracterizado porque
- 5 a) una muestra de la sangre a analizar es puesta en contacto con un reactivo de detección, que contiene, como mínimo, un sustrato de trombina, que está constituido por un residuo peptídico, que puede ser disociado por la trombina y que está unido amídicamente con intermedio del extremo carboxilo a una sustancia electrogénica y con un reactivo que contiene una cantidad conocida de factor X y un reactivo activador, que provoca la transformación
- 10 de factor X en factor Xa, de manera que la adición del reactivo que contiene una cantidad conocida de factor X a la muestra tiene lugar en una etapa común con la adición del reactivo activador a la muestra,
- b) la cantidad o la actividad de la sustancia electrogénica que es disociada del sustrato de trombina por la activación de la trombina inducida por el factor Xa y/o su comportamiento en el tiempo se determinan como señal de medición por procedimientos electroquímicos, y
- 15 c) con ayuda de esta señal de medición, se determina la cantidad de inhibidor de factor Xa en la muestra de sangre a analizar o una magnitud de medición correlacionada con aquélla, en particular un tiempo de coagulación que se correlaciona con éste.
- 20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza como reactivo activador un activador o un complejo asociado de la vía extrínseca de la coagulación plasmática, en particular, el factor tisular y/o el factor VIIa, o un activador o un complejo asociado de la vía intrínseca de la coagulación plasmática, en particular, el factor XIIa, o una sustancia que provoca una transformación de factor X en factor Xa.
- 25 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo que contiene una cantidad conocida de factor X y el reactivo activador se encuentran conjuntamente en estado seco y la transformación de factor X en factor Xa solo se produce por el contacto con la muestra.
- 30 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque el reactivo que contiene una cantidad conocida de factor X, el reactivo activador y el reactivo de detección se encuentran conjuntamente en estado seco y la transformación de factor X en factor Xa solo se produce por el contacto con la muestra.
- 35 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el inhibidor de factor Xa es una heparina, en particular, una heparina fraccionada o una heparina de bajo peso molecular, un inhibidor indirecto selectivo o un inhibidor directo de factor Xa.
6. Elemento de prueba que presenta un sensor electroquímico a base de química seca para la detección de inhibidores de factor Xa, en particular, de heparinas no fraccionadas y de heparinas fraccionadas o de bajo peso
- 40 molecular, de inhibidores indirectos selectivos de factor Xa y de inhibidores directos de factor Xa que presenta, sobre un soporte inerte, como mínimo dos electrodos y que contiene, como reactivos de química seca, un reactivo de detección que contiene, como mínimo, un sustrato de trombina constituido por un residuo peptídico que puede ser disociado por la trombina y que está unido amídicamente mediante el extremo carboxilo a una sustancia electrogénica así como, como mínimo, un reactivo que contiene una cantidad conocida de factor X y un reactivo
- 45 activador, que provoca la transformación de factor X y el factor Xa, encontrándose el reactivo activador sobre el elemento de prueba conjuntamente con el reactivo que contiene una cantidad conocida de factor X, eventualmente también conjuntamente con el reactivo de detección, de manera que la transformación de factor X en factor Xa solo se produce por el contacto con la muestra.
- 50 7. Sistema de análisis electroquímico con elemento de prueba, que contiene, como mínimo, un aparato de medición de la corriente eléctrica o de la tensión y un elemento de prueba, según la reivindicación 6.

