

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 616**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2010 E 10728593 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2486145**

54 Título: **Método para determinar el factor XIII con la ayuda de material de referencia a base de plasma**

30 Prioridad:

05.10.2009 DE 102009048199

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

02.10.2014

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;
PECHMANN, LENA;
VITZTHUM, FRANK y
ZANDER, NORBERT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 501 616 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para determinar el factor XIII con la ayuda de material de referencia a base de plasma

La presente invención se encuentra dentro del campo del diagnóstico in vitro, y hace referencia a un método para determinar el factor XIII de coagulación de la sangre (factor XIII, F XIII) con la ayuda de material de referencia a base de plasma.

El factor XIII es un factor de coagulación de la sangre que actúa al final de la cascada de coagulación, y que desempeña un papel importante para el cierre permanente de las heridas. En la última fase de la coagulación de la sangre, la de la formación de fibrina, la trombina disocia fibrinógenos. Los monómeros de fibrina así originados se agregan de forma espontánea formando fibras largas, conformando finalmente una red densa y ramificada de polímeros solubles de fibrina. El factor XIII también es activado por la trombina, originándose con ello el factor XIIIa. El factor XIIIa provoca un entrecruzamiento de los polímeros de fibrina, debido a lo cual el coágulo de fibrina se vuelve mecánicamente más estable, menos deformable y más resistente a la disolución mediante la plasmina. Una deficiencia congénita o adquirida de factor XIII puede producir una propensión a hemorragias, trastornos en la curación de heridas, así como puede conducir a que se produzcan abortos. Debido a la relevancia clínica que posee, la determinación de factor XIII para excluir o determinar una deficiencia de factor XIII es una parte fundamental del diagnóstico de coagulación.

El factor XIIIa, la forma activada de la proenzima catalíticamente inactiva del factor XIII, es una transglutaminasa que cataliza el entrecruzamiento tridimensional de los polímeros de fibrina, mediante la conformación de enlaces intermoleculares de amidas entre cadenas laterales de aminoácidos de lisilo y glutamilo de las moléculas de fibrina. En esta reacción se produce amoníaco (NH_3), además de liberarse iones de amonio (NH_4^+). En adelante, con el objetivo de simplificar, el término amoníaco se utilizará tanto para denominar el amoníaco, así como también para denominar a los iones de amonio. El fenómeno de la producción de amoníaco es utilizado en diferentes métodos de prueba para la determinación del factor XIII: Muszbek, L. y otros [Clin. Chem. (1985) 31(1), 35-40] describen un método para determinar el factor XIII en muestras de plasma defibrinadas, donde el factor XIII de la muestra es activado con trombina produciendo factor XIIIa. La muestra se mezcla, además, con β -caseína y etilamina, las cuales sirven como sustratos para la formación de enlaces intermoleculares de amida a través del factor XIIIa. Para comprobar cuantitativamente el amoníaco liberado en esta reacción, la muestra se mezcla de forma adicional con NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidruro) y con componentes de una reacción con indicador dependiente de NADPH, a saber, con glutamato deshidrogenasa (GLDH) y α -quetoglutarato. En presencia de amoníaco la GLDH transforma el α -quetoglutarato en glutamato. Esta reacción consume además NADPH, y se produce NADP^+ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), la forma oxidada de NADPH. La NADP^+ posee un espectro de absorción distinto del de la NADPH, de manera que la absorción (absorbancia o densidad óptica) de la mezcla de prueba se modifica proporcionalmente con respecto al consumo de NADPH y, con ello, proporcionalmente con respecto a la cantidad de amoníaco, y a la cantidad, así como a la actividad, del factor XIII. De manera alternativa, en esta mezcla de prueba puede utilizarse NADH en lugar de NADPH. A diferencia de la NADP^+ , junto con un máximo de absorción de aproximadamente 260 nm, la NADH posee un máximo de absorción de aproximadamente 340 nm. La posición exacta de los picos máximos de absorción por lo general depende de diferentes parámetros, en particular de las constantes de dielectricidad y del valor del pH de la solución. Por lo general, el pico máximo de absorción de la NADH se sitúa dentro del rango de 335 bis 345 nm. Por lo tanto, la medición del cambio en la absorción de la mezcla de prueba, por lo general, en el caso de una longitud de onda de aproximadamente 340 ± 5 nm, posibilita la determinación cuantitativa del factor XIII en una muestra.

En la solicitud EP 336 353 A2, así en como Fickenscher y otros (Thromb Haemost. 1991, 65(5): 535-40), se describe un método similar con el cual se determina la cantidad de factor XIII mediante el amoníaco liberado. En la solicitud EP 336 353 A2 se describe un método para determinar el factor XIII en muestras de plasma no tratadas previamente, las cuales contienen fibrina. Para impedir que se originen coágulos de fibrina que puedan generar alguna alteración en la mezcla de reacción, la muestra se mezcla de forma adicional con un inhibidor de agregación de fibrina. El factor XIII de la muestra es activado con trombina en presencia de iones de Ca^{2+} , produciendo factor XIIIa. La muestra se mezcla, además, con un péptido sintético que contiene glutamina y con etil éster de glicina, los cuales sirven como sustrato para la formación de enlaces intermoleculares de amida mediante el factor XIIIa. Para comprobar cuantitativamente el amoníaco liberado en esta reacción, la muestra se mezcla de forma adicional con NADH (nicotinamida adenina dinucleótido hidruro), y con componentes de una reacción con indicador dependiente de NADH, a saber, con glutamato deshidrogenasa (GLDH) y α -quetoglutarato. En presencia de amoníaco la GLDH transforma el α -quetoglutarato en glutamato. Esta reacción consume adicionalmente NADH y se produce NAD^+ , la forma oxidada de NADH. La NAD^+ posee otro espectro de absorción distinto al de la NADH, de manera que la absorción de la mezcla de prueba se modifica proporcionalmente con respecto al consumo de NADH y, con ello, proporcionalmente con respecto a la cantidad de amoníaco, y de forma proporcional con respecto a la actividad enzimática del factor XIII y a la cantidad de factor XIII. De manera alternativa, en esta mezcla de prueba puede utilizarse NADPH en lugar de NADH. La medición del cambio en la absorción de la mezcla de prueba, en el caso de una longitud de onda de 340 nm, posibilita la determinación cuantitativa del factor XIII en una muestra. Una prueba

comercial, basada en el principio de prueba descrito en la solicitud EP 336 353 A2, es la prueba Berichrom® F XIII Test de la empresa Siemens Healthcare Diagnostics.

5 En Karpati y otros, 2000, se revela un método para determinar cuantitativamente el factor XIII en una muestra de plasma, donde la actividad de transglutaminasa del factor XIIIa se mide mediante el consumo oxidativo de NADPH en la mezcla de prueba. Karpati y otros no indican que se utilice NADH o un análogo de NAD(P)H.

10 Con el fin de simplificar, el término NAD(P)H se utilizará cuando las ejecuciones hagan referencia tanto a la forma fosforilada como también a la forma no fosforilada de la NADH, es decir cuando se refiera tanto a la NADH como a la NADPH. Con el fin de simplificar, el término NAD(P)+ se utilizará cuando las ejecuciones hagan referencia tanto a la forma fosforilada como también a la forma no fosforilada de la NADH+ en el estado oxidativo, es decir cuando se refiera tanto a la NAD+ como a la NADP+.

15 En los métodos de prueba descritos, en lugar de NADH o NADPH pueden emplearse también análogos de NADH o de NADPH, los así llamados análogos NAD(P)H. Se consideran preferentes aquellos análogos que presentan un máximo de absorción que se sitúa por encima de 350 nm. Un análogo es una sustancia que imita el efecto biológico de la fisiología deseada, es decir, en este caso por ejemplo una sustancia que puede actuar como la NAD(P)+ o la NAD(P)H como cosustrato. Dicho análogo debe tratarse de un análogo en el cual la forma oxidativa y reducida posea máximos de absorción diferentes, donde el máximo de absorción del análogo de la NAD(P)H se sitúe por encima de 350 nm. Preferentemente, deben emplearse análogos de estructura en los cuales el grupo nicotinamida fue cambiado por otro grupo. Se consideran preferentes los compuestos cíclicos, en particular compuestos heterocíclicos, donde se consideran completamente preferentes los análogos de piridina, es decir por ejemplo, 3-acetilpiridina, 3-(carb)-aldehído piridina, tionicotinamida, selenonicotinamida, etc.

20 Los métodos correspondientes al estado del arte, así como otros métodos para determinar la actividad del factor XIII, basados en la comprobación de la formación de amoníaco en la mezcla de prueba, presentan la desventaja de que en las muestras con bajas concentraciones de factor XIII se mide con frecuencia una actividad demasiado elevada del factor XIII. Incluso se ha observado que en muestras de plasma de pacientes con una grave deficiencia adquirida de factor XIII, en las cuales no pudo identificarse el factor XIII mediante métodos inmunológicos y mediante otros métodos, fue detectada una actividad del factor XIII de un 8-14 %, con la prueba Berichrom® F XIII Test (Lim, W. y otros, J Thromb Haemost 2004; 2: 1017-1019). Una determinación correcta de la actividad del factor XIII, sin embargo, justamente en muestras con bajas concentraciones de factor XIII, es una condición esencial para una terapia óptima de los pacientes con un concentrado de factor XIII.

30 Se desconoce el motivo por el cual la actividad del factor XIII se determina erróneamente como demasiado elevada. Como posible causa se estima un consumo de NADH o de NADPH independiente del factor XIIIa, provocado probablemente por enzimas que se encuentran contenidas en las muestras de los pacientes y que utilizan la NADH, así como la NADPH, como cofactor, o mediante la producción de amoníaco no específica en la muestra del paciente, la cual llevaría a un consumo de NADH- o de NADPH independiente del factor XIIIa (Ajzner, E and Muszbek, L.; J Thromb Haemost 2004; 2: 2075-2077). Para solucionar el problema de los valores de la actividad del factor XIII determinada como demasiado elevada, Ajzner & Muszbek proponen mezclar en una carga paralela un segundo alícuota de la muestra del paciente con yodoacetamida y determinar la actividad del factor XIII. La yodoacetamida inhibe la actividad de la transglutaminasa del factor XIII activado. El cambio en la absorbancia que se mide en esa carga paralela corresponde al consumo de NADH o NADPH independiente del factor XIIIa, el cual entonces puede restarse de la actividad que se mide en la mezcla de prueba normal, no tratada con yodoacetamida. De este modo, se puede corregir la actividad del factor XIII medida en la mezcla de prueba normal.

40 No obstante, en este método para corregir la actividad del factor XIII, se considera como una desventaja que cada muestra del paciente deba medirse dos veces, una vez sin yodoacetamida y otra vez con yodoacetamida. Un procedimiento de este tipo no sólo duplicaría los costes de la prueba, sino también los costes para una determinación del factor XIII. Además, no está aclarado si la utilización de yodoacetamida es adecuada para los usos de rutina en análisis de coagulación.

45 Por consiguiente, es objeto de la presente invención proporcionar medios y métodos para determinar el factor XIII, los cuales, sin la medición de una carga paralela, posibiliten determinar correctamente el factor XIII, en particular en muestras de plasma con concentraciones o actividad reducidas del factor XIII.

50 Este objeto se alcanza gracias a que se utiliza exclusivamente plasma como material de referencia para una actividad del factor XIII menor al 100 % del valor estándar.

55 En los métodos conocidos para determinar el factor XIII en muestras de plasma se utiliza generalmente como material de referencia un pool de plasma normal, por ejemplo generalmente del plasma de al menos 20 donantes aparentemente sanos. La actividad del factor XIII de ese plasma normal se define como el 100% o como el valor estándar, o se compara con la actividad del factor XIII de un plasma de referencia según el estándar internacional,

debido a lo cual al plasma normal se le puede asignar un valor de actividad del factor XIII. Para proporcionar referencias con una actividad del factor XIII reducida (< 100 %) se preparan diluciones de ese plasma normal. Como agentes de dilución se utilizan por lo general soluciones acuosas, como por ejemplo una solución de NaCl al 0,9 %. A modo de ejemplo, una parte de plasma normal es mezclada con dos partes de una solución tampón adecuada (dilución 1:2) y se define como referencia con una actividad del factor XIII de 33,33 % del valor estándar. A través de la medición del plasma normal y de una serie de diluciones del plasma normal, con la ayuda de la prueba del factor XIII estandarizada, se elabora una curva de referencia (curva de calibración), en donde las actividades definidas del factor XIII (por ejemplo, en % del valor estándar) se asignan a los valores en bruto medidos. Para las muestras de pacientes puede entonces medirse el valor en bruto en el sistema de prueba estandarizado y, finalmente, mediante la curva de referencia, convertirlo en un valor calibrado, así como en un resultado estandarizado de la prueba, por ejemplo en un % del valor estándar.

Se ha comprobado que utilizando referencias para el valor estándar de la actividad del factor XIII (100 %), y para actividades del factor XIII que están por debajo del valor estándar (< 100 %), que se componen exclusivamente de plasma, se obtiene una curva de referencia que posibilita una determinación correcta de factor XIII, en particular en muestras de plasma con una concentración reducida de factor XIII, mediante un método en donde la actividad de la transglutaminasa del factor XIII activado se mide mediante el consumo de NAD(P)H en la mezcla de prueba.

Un objeto de la presente invención consiste en un método para la determinación cuantitativa de factor XIII en una muestra de plasma, donde la actividad de la transglutaminasa del factor XIIIa activado se mide mediante el consumo oxidativo de NAD(P)H en la mezcla de prueba, y donde el valor de medición determinado se compara con valores de referencia que se determinan con la ayuda de materiales de referencia, donde al menos los materiales de referencia que presentan una actividad reducida del factor XIII, en comparación con el valor estándar, consisten en plasma.

Como un método para determinar cuantitativamente el factor XIII en una muestra de plasma, en donde la actividad de la transglutaminasa del factor XIIIa activado se mide mediante el consumo oxidativo de NAD(P)H en la mezcla de prueba, debe entenderse, por ejemplo, un método en donde una muestra de plasma se mezcla

I. con una sustancia o con una mezcla de sustancias para activar el factor XIII para producir factor XIIIa,

II. con un sustrato aceptor para el factor XIIIa con al menos un grupo glutaminilo,

III. con un sustrato donante de grupos amino para el factor XIIIa,

IV. con NAD(P)H o con un análogo de NAD(P)H

y

V. con un agente que en presencia de amoníaco puede oxidar NAD(P)H produciendo NADP⁺,

donde se mide el cambio en la absorción de la mezcla de prueba.

Como sustancia para activar el factor XIII para producir factor XIIIa, se considera especialmente adecuada la trombina, por ejemplo de origen humano o bovino, o también trombina producida de forma recombinante, de forma preferente en presencia de iones de calcio. Se consideran igualmente apropiadas las sustancias o mezclas de sustancias, como por ejemplo el factor Xa, la ecarina procedente de veneno de serpiente o una mezcla de factor tisular, fosfolípidos e iones de Ca²⁺ que indirectamente provocan la activación del factor XIII, lo que activa de forma directa o indirecta la protrombina contenida en la muestra produciendo trombina, la cual a su vez activa el factor XIII.

La expresión "sustrato aceptor para el factor XIIIa con al menos un grupo glutaminilo" debe entenderse como un polipéptido o péptidomiméticos que presentan al menos un grupo glutaminilo, por ejemplo del aminoácido amida de ácido glutámico. Sustratos aceptores conocidos para el factor XIIIa son, por ejemplo, la β-caseína, así como una pluralidad de péptidos sintéticos. Péptidos sintéticos adecuados se describen, por ejemplo, en la solicitud EP 314 023 A2.

La expresión "sustrato donante de grupos amino para el factor XIIIa" debe entenderse en particular como aminas primarias. Se consideran aminas primarias preferentes la etanolamina, putrescina, cadaverina, diaminoetano, aminoetano. Como aminas primarias especialmente preferentes se consideran el etil éster de glicina y el metil éster de glicina.

El término "NADH" es la abreviatura del compuesto nicotinamida adenina dinucleótido hidruro. Dentro del sentido de la presente invención, como consumo de NADH debe entenderse la oxidación de NADH para producir NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido). El término "NADH" debe entenderse de forma amplia, y comprende también los siguientes análogos de NADH que pueden oxidarse de forma análoga, y que igualmente en forma oxidada disponen

de propiedades ópticas diferentes a las de su forma reducida, de manera que su consumo puede ser medido fotométricamente. NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidruro, que puede oxidarse produciendo NADP+), tio-NADH (tio-nicotinamida adenina dinucleótido hidruro, que puede oxidarse produciendo tio-NAD+), tio-NADPH (tio-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidruro, que puede oxidarse produciendo tio-NADP+), seleno-NADH (seleno-nicotinamida adenina dinucleótido hidruro, que puede oxidarse produciendo seleno-NAD+) y seleno-NADPH (seleno-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidruro, que puede oxidarse produciendo seleno-NADP+). Al utilizar NADH o NADPH se mide el cambio en la absorbancia a consecuencia de la oxidación para producir NAD+, así como NADP+ en el caso de una longitud de onda de aproximadamente 340 nm. Al utilizar tio-NADH, tio-NADPH, seleno-NADH o seleno-NADPH se mide el cambio en la absorbancia a consecuencia de la oxidación para producir tio-NAD+, tio-NADP+, seleno-NAD+ o seleno-NADP+, en el caso de longitudes de onda desde aproximadamente 340 nm hasta aproximadamente 430 nm.

Un "agente que en presencia de amoniaco puede oxidar NAD(P)H produciendo NADP+" consiste preferentemente en una enzima/sistema de sustrato que comprende una enzima y un sustrato para la enzima, donde la enzima actúa catalíticamente sobre el sustrato y en presencia de amoniaco oxida NADH para producir NAD+, así como los análogos de NADH antes mencionados. Son apropiados, por ejemplo, los siguientes sistemas de enzima/sustrato: el sistema de glutamato deshidrogenasa/ quetoglutarato, el sistema de alanina-deshidrogenasa/piruvato, el sistema de serina-2-deshidrogenasa/ 3-hidroxipiruvato, el sistema de valina deshidrogenasa/ 3-metil-2-oxobutanoato, el sistema de leucina deshidrogenasa/4-metil-2-oxopentanoato, el sistema de glicina deshidrogenasa /glioilato, el sistema de lisina deshidrogenasa/1,2-didehidropiperidina-2-carboxilato, el sistema de fenilalanina/fenilpiruvato, el sistema de aspartato deshidrogenasa/oxaloacetato o el sistema de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa/Dglucono- 1,5-lactona-6-fosfato.

De manera preferente, la muestra de plasma se mezcla adicionalmente con un inhibidor de agregación de fibrina. Los inhibidores de agregación de fibrina son sustancias que impiden la agregación de monómeros de fibrina inducidos por trombina. De este modo, se impide la aparición de un coágulo de fibrina en una muestra que contiene fibrinógenos, lo cual, de lo contrario, afectaría negativamente la medición de la absorción de la mezcla de prueba. Los inhibidores de agregación de fibrina considerados como preferentes son los péptidos sintéticos, como por ejemplo un péptido de la secuencia Gly-Pro-Arg-Pro (el cual puede obtenerse a través del comercio como Pefabloc®FG, Pentapharm, Suiza). Otros péptidos considerados como preferentes que pueden utilizarse como inhibidores de agregación de fibrina, en particular el péptido de la secuencia Gly-Pro-Arg-Pro-Ala, considerado como preferente, se describen en la solicitud EP 456 152 A2.

Preferentemente, la muestra se mezcla de forma adicional con una sustancia neutralizante de heparina, por ejemplo, con bromuro de hexadimetrina (conocido también como Polybrene®), para suprimir el efecto inhibidor de trombina de la heparina, la cual puede estar presente, por ejemplo, en muestras de pacientes que están sometidos a una terapia con heparina.

Los componentes I a V que se mezclan con la muestra para formar una mezcla de prueba pueden mezclarse respectivamente de forma individual, es decir en forma de reactivos individuales, siendo mezclados con la muestra de forma sucesiva; pero también pueden concentrarse en un sólo reactivo que es agregado a la mezcla en un único paso de pipeteado. El reactivo o los reactivos, de manera preferente, comprenden una matriz de solución tampón en la que se disuelven las sustancias. Una matriz de solución tampón adecuada contiene, por ejemplo, HEPES, bicina, NaCl, albúmina y/o conservantes, como por ejemplo azida de sodio y, preferentemente, posee un valor de pH de 6,0 a 9,0, de forma especialmente preferente de 6,5 a 8,5. Puesto que para la activación del factor XIII son necesarios iones de calcio, la matriz de solución tampón contiene además una sal de calcio, preferentemente cloruro de calcio. La mezcla del reactivo o de los reactivos con la muestra puede efectuarse de forma manual o en dispositivos automáticos de coagulación.

Siempre que en el método de acuerdo con la invención se utilice el sistema glutamato deshidrogenasa/ quetoglutarato, como agente que en presencia de amoniaco puede oxidar NADH produciendo NADP+, la cantidad de glutamato deshidrogenasa que se agrega a la mezcla de prueba se escoge de manera que la concentración final en la mezcla de prueba se sitúe en un rango de 10 - 500 IU/mL, preferentemente de 40 - 240 IU/mL.

Como material para las mezclas es adecuado, en particular, plasma que contenga fibrinógenos. No obstante, también puede determinarse el factor XIII en plasma desfibrinado de acuerdo con el método de la invención.

La medición del cambio en la absorción (ΔA) de la mezcla de prueba se efectúa con la ayuda de un fotómetro que contiene una fuente de luz que emite un haz de luz a través de una mezcla de prueba a ser medida, y un detector que mide la intensidad de la luz permeada y la convierte en una señal eléctrica. La medición del cambio en la absorción se efectúa dependiendo de si se utiliza NADH, así como NADPH o tio-NADH, tio-NADPH, seleno-NADH, así como seleno-NADPH, con luz en una longitud de onda desde aproximadamente 340 nm a aproximadamente 430 nm. El cambio en la absorción por unidad de tiempo se correlaciona con la actividad del factor XIII. La disminución de la absorción (A) de la mezcla de prueba mediante el consumo del análogo de NADH- o de NADH, en particular en el rango lineal de la cinética de reacción, es directamente proporcional a la actividad del factor XIII.

El valor de medición determinado de una muestra de plasma es, en primer lugar, un valor en bruto que a continuación se compara con valores de referencia que fueron determinados con la ayuda de materiales de referencia. Dentro del sentido de la presente invención, se entiende como material de referencia un material cuya concentración, así como actividad del factor XIII, son conocidas.

5 De acuerdo con la presente invención, al menos los materiales de referencia que presentan una actividad reducida del factor XIII, en comparación con el valor estándar, (< 100 % d. N.), consisten en plasma. El término "plasma" debe entenderse como la parte líquida, libre de células de la sangre de uno o de más donantes, preferentemente de donantes humanos, la cual - del modo habitual en la analítica de coagulación - se obtuvo mediante la separación de componentes celulares de la sangre, de sangre total anticoagulada. Para impedir la coagulación de la sangre en una muestra de sangre total, cada muestra de sangre - a menudo ya durante la toma de sangre- se mezcla con un anticoagulante, preferentemente con una solución de citrato de sodio. Otros anticoagulantes comunes son la heparina de sodio, heparina de litio, EDTA o citrato-fosfato-dextrosa (CPD). De este modo, cada plasma contiene con seguridad una cierta parte en volumen de anticoagulante.

15 Se denomina como plasma normal una mezcla de plasmas de varios donantes aparentemente sanos (pool de plasma). Por definición, un plasma normal presenta una concentración de factor XIII y, con ello, una actividad del factor XIII del 100 %. Un plasma con deficiencia de factor XIII es un plasma que no presenta actividad del factor XIII o al menos no más de un 1% de la actividad normal del factor XIII. Un plasma con deficiencia de factor XIII puede obtenerse, por ejemplo, de pacientes con un fenotipo correspondiente, o a partir de un plasma normal por medio de inmunoadsorción selectiva del factor XIII mediante anticuerpos específicos. Con el fin de brindar una información completa, debe indicarse que la actividad efectiva del factor XIII de distintos plasmas normales varía según el fabricante, carga, envasado, etc. La actividad efectiva del factor XIII de un plasma normal se determina a través de la comparación con un plasma según el estándar internacional para factor XIII. La actividad efectiva del factor XIII de un plasma normal se sitúa, por lo general, entre un 80 % y un 120 % del plasma según el estándar internacional.

25 Un material de referencia acorde a la invención que presenta una actividad reducida del factor XIII, en comparación con el valor estándar, puede estar compuesto de una mezcla de plasma normal y de plasma con deficiencia de factor XIII. Para ello, el plasma normal se mezcla con un plasma con deficiencia de factor XIII en partes, de tal manera que la mezcla obtenida presente la actividad deseada de factor XIII. Si por ejemplo se mezcla una parte de plasma normal con dos partes de un plasma con deficiencia de factor XIII (dilución 1:2), se obtiene un material de referencia con una actividad del factor XIII de un 33,33 % del valor estándar. Un material de referencia acorde a la invención que presenta una actividad reducida del factor XIII, en comparación con el valor estándar, puede estar compuesto además de un plasma con deficiencia de factor XIII al cual se agregó factor XIII purificado, es decir aislado, en una cantidad tal que se alcance la actividad deseada del factor XIII. Se considera adecuado el factor XIII humano, animal o producido de forma recombinante. Un material de referencia de acuerdo con la invención que no presenta actividad del factor XIII ($\leq 1\%$) se compone preferentemente de plasma con deficiencia de factor XIII.

35 De acuerdo con la invención, para la determinación de los valores de referencia, así como para elaborar la curva de referencia para actividades del factor XIII por debajo del valor estándar (< 100 %), se emplean exclusivamente materiales de referencia compuestos por plasma. En una forma de ejecución preferente, para la determinación del valor de referencia para una actividad del factor XIII correspondiente al valor estándar (100 %), se utiliza un material de referencia que consiste en plasma normal. En una forma de ejecución igualmente preferente, para determinar los valores de referencia, así como para elaborar la curva de referencia para actividades del factor XIII por encima del valor estándar (> 100 %), se utilizan materiales de referencia que consisten en plasma normal a los cuales se agrega factor XIII aislado en una cantidad tal que se alcanza una actividad del factor XIII por encima del valor estándar.

45 Otro objeto de la presente invención consiste en la utilización de plasma con deficiencia de factor XIII para producir material de referencia adecuado para ejecutar un método para determinar el factor XIII de forma cuantitativa. Del modo antes descrito, el plasma con deficiencia de factor XIII puede utilizarse como agente de dilución para plasma normal, para producir así materiales de referencia que consisten en plasma y que presentan una actividad del factor XIII por debajo del valor estándar (< 100 %). Sin embargo, el plasma con deficiencia de factor XIII puede emplearse también como matriz a la cual se agrega factor XIII purificado, es decir aislado, en una cantidad tal que se produce un material de referencia que presenta una actividad deseada de factor XIII por debajo o por encima del valor estándar.

55 Otro objeto de la presente invención consiste en un material de referencia con una actividad reducida del factor XIII (< 100 %), en comparación con el valor estándar, el cual consiste en una mezcla de plasma normal y de plasma con deficiencia de factor XIII, o de un plasma con deficiencia de factor XIII al cual se agrega factor XIII purificado, es decir aislado, en una cantidad tal que éste presenta una actividad del factor XIII por debajo del valor estándar. Un material de referencia de acuerdo con la invención puede proporcionarse de forma líquida o de forma liofilizada.

A este respecto, se menciona un kit que contiene plasma normal como unidad separada, y un plasma con deficiencia de factor XIII, respectivamente, en forma líquida o liofilizada. Con la ayuda del plasma normal puede determinarse el valor de referencia para el valor estándar de la actividad del factor XIII (100 %). Con la ayuda del

plasma con deficiencia de factor XIII puede determinarse el valor de referencia para una actividad con deficiencia del factor XIII (0 %). Con la ayuda de mezclas de los dos plasmas, las cuales pueden ser realizadas a voluntad por el usuario, pueden determinarse valores de referencia para cada actividad reducida del factor XIII (< 100 %), en comparación con el valor estándar.

5 Se menciona, además, un kit que contiene al menos un material de referencia como unidad separada, en forma líquida o liofilizada, que presenta una actividad reducida del factor XIII (< 100 %), en comparación con el valor estándar, y consiste en plasma, preferentemente de una mezcla de plasma normal y de plasma con deficiencia de factor XIII. Preferentemente, un kit de prueba de acuerdo con la invención contiene un plasma normal como unidad separada y/o un plasma con deficiencia de factor XIII como unidad separada.

10 Descripción de las figuras

Figura 1: curvas de calibración de la prueba de factor XIII Berichrom® a base de NADH, así como de la prueba de factor XIII a base de tio-NADH conforme al estado de arte, con solución de NaCl como agente de dilución para el plasma estándar.

15 Figura 2: curvas de calibración de la prueba de factor XIII Berichrom® a base de NADH, así como de la prueba de factor XIII a base de tio-NADH de acuerdo con la invención con plasma con deficiencia de factor XIII como agente de dilución para el plasma estándar.

Figura 3: comparación de la recuperación de muestras de una actividad del factor XIII diferente, con la ayuda de la prueba de factor XIII Berichrom® a base de NADH, realizada con NaCl o plasma con deficiencia de factor XIII como agente de dilución para el plasma estándar.

20 Figura 4: comparación de la recuperación de muestras de una actividad del factor XIII diferente, con la ayuda de la prueba de factor XIII a base de tio-NADH, realizada con NaCl o plasma con deficiencia de factor XIII como agente de dilución para el plasma estándar.

Ejemplos

Ejemplo 1:

25 Determinación del factor XIII

En el siguiente ejemplo se determinó el contenido de factor XIII en muestras de plasma con reactivos que contienen NADH o tio-NADH como componente activo. El reactivo a base de NADH se describe en la solicitud EP 336 353 A2, así como también en Fickenscher y otros (Thromb Haemost. 1991, 65(5): 535-40) se describe su composición, y es comercializado por la empresa Siemens Healthcare Diagnostics (Alemania) como reactivo de factor XIII Berichrom®.

30 El reactivo a base de tio-NADH posee la siguiente composición:

Reactivo activador (pH 8,3):

- 292 µM tio-NADH (Oriental Yeast Company, Rotterdam, Países Bajos)
- Trombina de bovino (10 IU/mL)
- Gly-Pro-Arg-Pro-Ala-amida como inhibidor de agregación de fibrina (2g/L)

35 • Cloruro de calcio (1,2 g/L)

- Bromuro de hexadimetrina (10 mg/L)
- Albúmina de bovino
- Solución tampón de bicina (100 mmol/L)

Reactivo de detección (pH 6,5):

40 • Glutamato deshidrogenasa (160 U/mL)

- Leu-Gly-Pro-Gly-Gln-Ser-Lys-Val-Ile-Gly-amida como sustrato aceptor para el factor XIII (2,4 g/L)

- ADP
 - Etil éster de glicina (1,4 g/L)
 - α -quetoglutarato (2,7 g/L)
 - Albúmina de bovino
- 5 • Solución tampón HEPES (10 mmol/L)

10 Para la prueba, en el analizador de coagulación BCS® XP (de la empresa Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania), de los respectivos reactivos se combinaron, en una cubeta, 75 μ L de reactivo activador, 75 μ L de reactivo de detección y 15 μ L de una muestra de plasma, y fueron incubados a 37 °C. Después de 5 minutos comenzó la medición de la absorbancia. Las mezclas de prueba con el reactivo de NADH de la prueba de factor XIII Berichrom® se midieron con luz con una longitud de onda de 340 nm. Las mezclas de prueba con el reactivo de tio-NADH se midieron con luz con una longitud de onda de 405 nm. Para la valoración se calculó el cambio en la absorbancia por minuto en un intervalo de tiempo de 60 segundos - 350 segundos, después del inicio de la medición. Para la calibración, es decir, para determinar los valores de referencia, se utilizó plasma normal (plasma humano estándar de la empresa Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania) como estándar con una concentración de factor XIII del 100 % del valor estándar (porcentaje del valor estándar) (comparado con el estándar internacional para el factor XIII, este plasma normal contenía 95 % F XIII). Los puntos de calibración con una concentración reducida del factor XIII, es decir valores de referencia que representan una actividad reducida del factor XIII, en comparación con el valor estándar, se obtuvieron conforme a la invención mediante la dilución del plasma estándar con plasma con deficiencia de factor XIII, así como según el estado del arte mediante la dilución del estándar con una solución de NaCl al 0,9 %. El plasma con deficiencia de factor XIII fue producido por la empresa Innovative Research (USA), con anticuerpos monoclonales contra las cadenas alfa, así como beta, del factor XIII, de forma análoga con respecto al procedimiento descrito en la solicitud EP 0 826 965 A1. Los puntos de calibración con una concentración del factor XIII más elevada que el estándar, es decir valores de referencia que representan una actividad del factor XIII elevada en comparación con el valor estándar, fueron obtenidos mediante un volumen aumentado del plasma estándar en la mezcla de prueba.

En la figura 1 se muestran curvas de calibración típicas de las pruebas realizadas con los dos reactivos, con solución de NaCl como agente de dilución. En la figura 2 se muestran curvas de calibración típicas de las pruebas realizadas de acuerdo con la invención con los dos reactivos, con plasma con deficiencia de factor XIII como agente de dilución.

30 A continuación, se midieron con los dos reactivos muestras con un contenido diferente de factor XIII, y los resultados de las pruebas fueron evaluados mediante las respectivas curvas de calibración. Las muestras fueron realizadas mediante la mezcla de un pool de plasma con actividad de factor XIII elevada conocida, con un plasma con deficiencia de factor XIII en diferentes proporciones. A partir de los valores de la actividad del factor XIII de los plasmas iniciales, así como de la proporción de la mezcla, se calculó el valor teórico de la actividad del factor XIII de cada muestra. Después de la medición de las muestras, mediante la comparación de los valores de medición determinados de forma efectiva, con los valores de actividad del factor XIII calculados previamente de forma teórica, se calculó la recuperación porcentual de cada muestra. Una recuperación mayor al 100 % equivale a un resultado de la prueba con un valor demasiado elevado erróneo. Del modo que se muestra en la figura 3, para la prueba de factor XIII Berichrom® a base de NADH la recuperación en las muestras con una actividad del factor XIII menor al 20 %, fue más próxima al 100 % cuando, de acuerdo con la invención, se utilizó plasma con deficiencia de factor XIII como agente de dilución para el estándar en lugar del NaCl prescrito para la prueba. Del modo que se muestra en la figura 4, para la prueba a base de tio-NADH la mejora de la recuperación de muestras con contenido reducido de factor XIII es incluso aún más acentuada.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la determinación cuantitativa del factor XIII en una muestra de plasma, donde la actividad de la transglutaminasa del factor XIIIa activado se mide mediante el consumo oxidativo de NAD(P)H o de un análogo de NAD(P)H en la mezcla de prueba, y el valor de medición determinado se compara con valores de referencia que son determinados con la ayuda de materiales de referencia, **caracterizado porque** al menos los materiales de referencia que presentan una actividad reducida del factor XIII, en comparación con el valor estándar, consisten en plasma.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde al menos un material de referencia que presenta una actividad reducida del factor XIII, en comparación con el valor estándar, consiste en una mezcla de plasma normal y de plasma con deficiencia de factor XIII.
3. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un material de referencia que presenta una actividad reducida del factor XIII, en comparación con el valor estándar, consiste en plasma con deficiencia de factor XIII al que se agrega factor XIII aislado.
- 15 4. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde el material de referencia que no presenta actividad del factor XIII consiste en plasma con deficiencia de factor XIII.
5. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde el material de referencia que presenta una actividad del factor XIII del 100 % consiste en plasma normal.
- 20 6. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un material de referencia que presenta una actividad reducida del factor XIII, en comparación con el valor estándar, consiste en plasma normal al que se agrega factor XIII aislado.
7. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde la actividad de la transglutaminasa del factor XIIIa activado se mide mediante el consumo oxidativo de un análogo de NAD(P)H en la mezcla de prueba, y donde el análogo de NAD(P)H es tio-NAD(P)H o seleno-NAD(P)H.

Figura 1

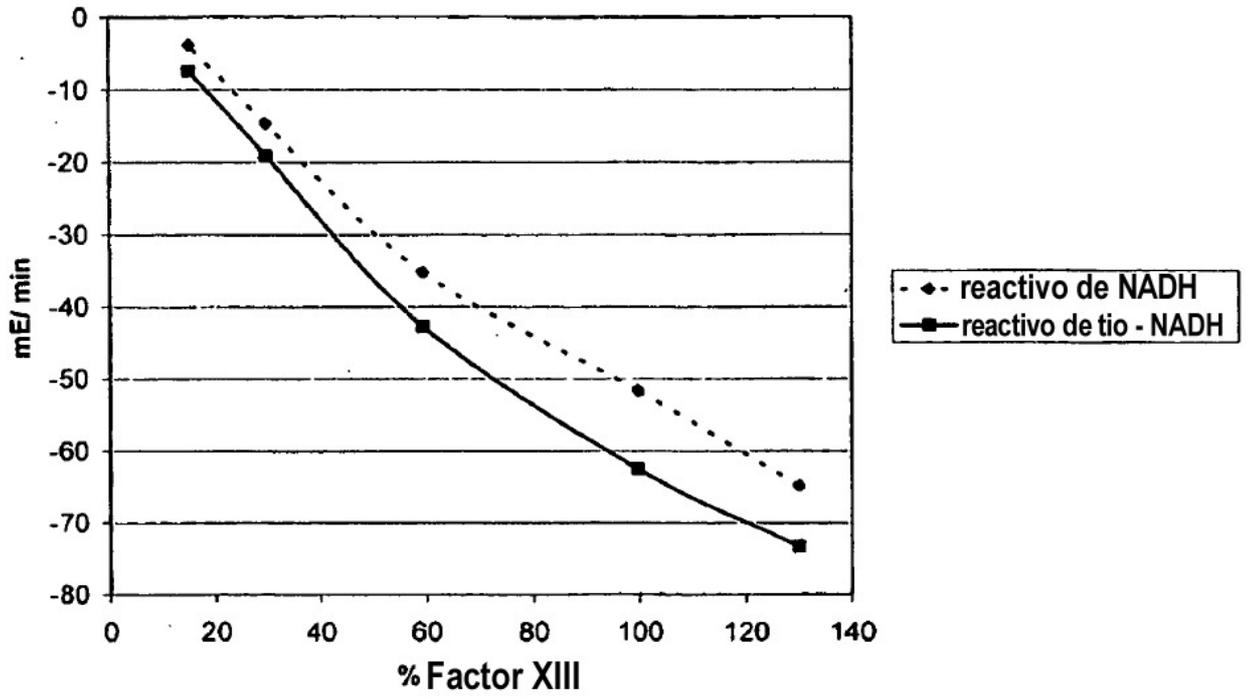


Figura 2

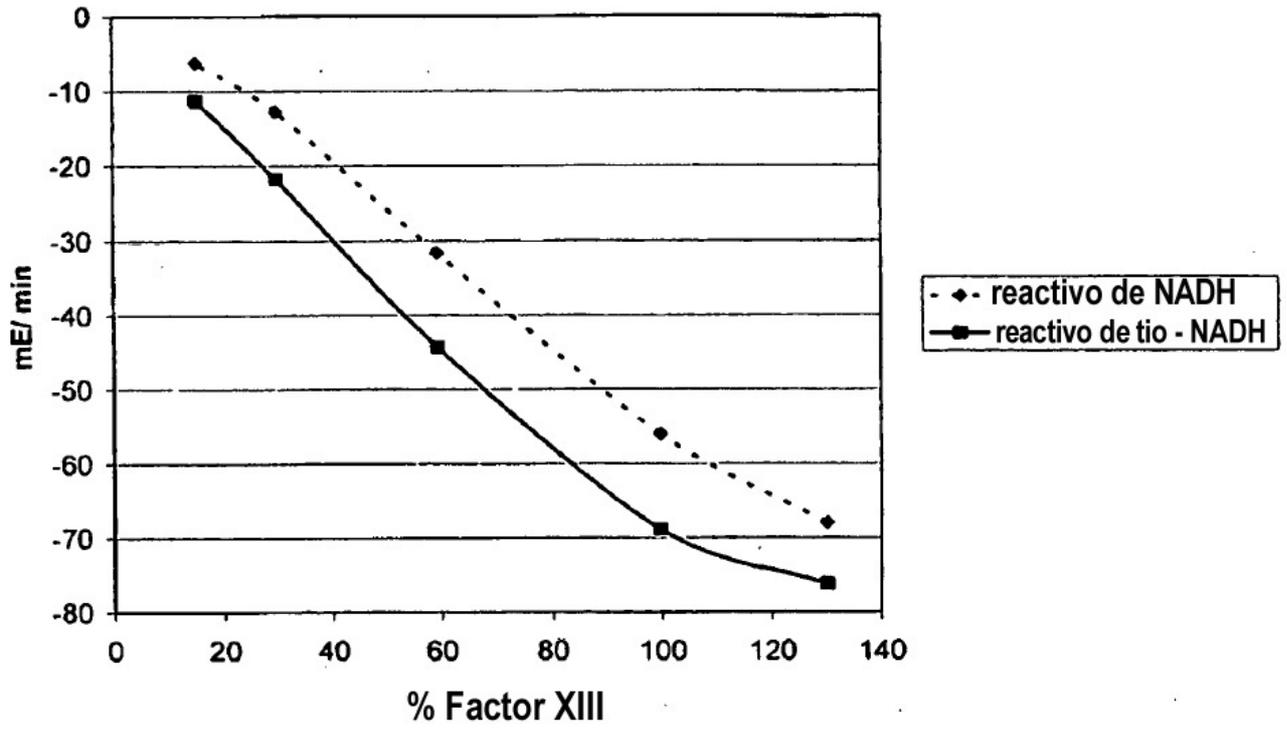


Figura 3

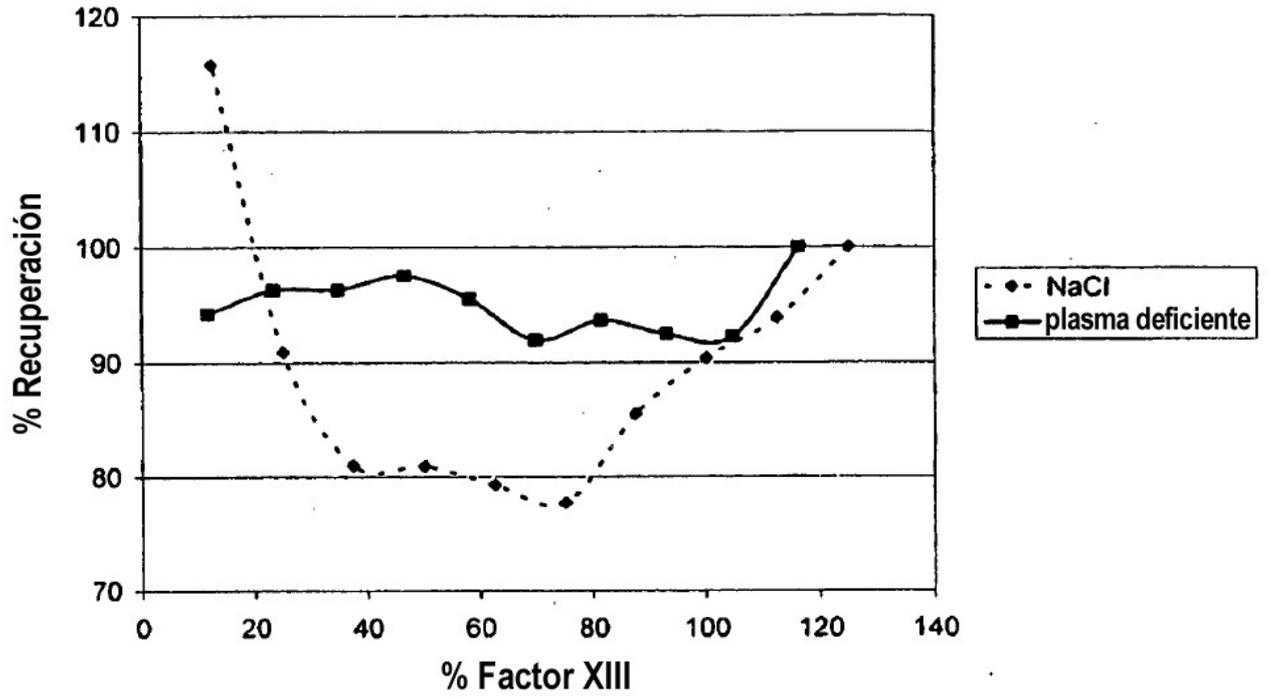


Figura 4

