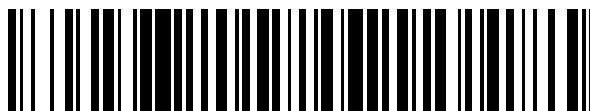


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 196**

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: **23.01.2012 E 12152034 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2484776**

54 Título: **Procedimiento insensible a heparina para la determinación de inhibidores directos del factor de coagulación**

30 Prioridad:

**07.02.2011 EP 11153524**

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

**21.01.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRAUN, KONRAD;  
KLEIN, WOLFGANG;  
ZANDER, NORBERT y  
TIMME, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 527 196 T3**

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

**DESCRIPCION**

Procedimiento insensible a heparina para la determinación de inhibidores directos del factor de coagulación

5 La presente invención se sitúa en el campo del diagnóstico de coagulación, y se refiere a un procedimiento insensible a heparina para la determinación de inhibidores directos del factor de coagulación en una muestra, en especial de inhibidores directos de trombina y factor Xa, así como a un kit de ensayo para el empleo en tal procedimiento.

10 En la terapia anticoagulación se emplean en medida creciente nuevos inhibidores de coagulación directos, en especial inhibidores directos de trombina (factor IIa) y factor Xa. Estos nuevos inhibidores de coagulación tienen el potencial para eliminar los inhibidores indirectos de coagulación empleados hasta la fecha, sobre todo heparina y sus derivados, que desarrollan su acción inhibitoria de coagulación sólo en cooperación con factores como el cofactor II antitrombina o heparina. No obstante, actualmente se emplean particularmente las diferentes heparinas.

15 La acción inhibitoria de coagulación de todas las heparinas se basa en su formación de complejos con antitrombina (AT, antitrombina III), el más importante inhibidor plasmático de factores de coagulación activados. La antitrombina pertenece al grupo de inhibidores de serinproteasas (serpinas), e inhibe factores de coagulación trombina (factor IIa, FIIa) y factor Xa (FXa), así como, en medida reducida, también las demás serinproteasas FIXa, FXIa, FXIIa, calicreína y plasmina. Mediante la unión de heparina a antitrombina se llega a un cambio de conformación de la antitrombina, que refuerza la acción inhibitoria de antitrombina en un múltiplo. El punto de unión en moléculas de heparina, que es responsable de la unión a antitrombina, está constituido por una secuencia de pentasacáridos característica. Una forma completamente sintética de este pentasacárido (fondaparinux) se emplea, al igual que UFH o LMWH, para la inhibición medicamentosa de la capacidad de coagulación.

25 Las heparinas no fraccionadas (UFH) y heparinas fraccionadas, derivados de heparina, heparinoides, o bien pentasacáridos, se diferencian en un acción anticoagulatória. Mientras que UHF inhiben igualmente trombina y factor Xa, LMWH presentan predominantemente una acción inhibitoria del factor Xa, y sólo en medida reducida una acción inhibitoria de trombina. Los pentasacáridos, como fondaparinux, inhiben selectivamente el factor Xa, y no muestran inhibición de trombina en absoluto.

30 No obstante, en ciertos cuadros patológicos, como por ejemplo en el caso de una trombocitopenia inducida por heparina (HIT), se debe interrumpir el tratamiento con heparina, y se debe administrar al paciente otros anticoagulantes, preferentemente inhibidores directos de trombina y/o factor Xa. En tales pacientes es necesario disponer de métodos diagnósticos que posibiliten determinar la inhibición de trombina, o bien factor Xa, mediante los inhibidores indirectos, independientemente de la inhibición de trombina, o bien factor Xa, mediante inhibidores indirectos eventuales, como por ejemplo heparina.

35 La determinación de inhibidores de trombina, o bien factor Xa, se efectúa habitualmente con ayuda de procedimientos de ensayo cromógenos. En estos procedimientos se mezcla la muestra del paciente, que contiene un inhibidor de trombina, o bien factor Xa, con una cantidad definida del correspondiente factor de coagulación activado y un sustrato cromógeno para el factor de coagulación activado, y se mide la actividad remanente en la carga de reacción mediante fotometría. Cuanto más elevada es la concentración de inhibidor en la muestra del paciente, tanto más se inhibe la actividad del factor de coagulación añadido, y tanto más reducida es la actividad medida en la carga de reacción. A modo de ejemplo en la EP 0034320 B1 o en la EP 0004271 A2 se describen tales procedimientos de ensayo cromógenos, basados en trombina, o bien factor Xa.

40 No obstante, en este principio de ensayo es desfavorable que se mide cualquier tipo de actividad inhibitoria de trombina, o bien factor Xa, sin poder diferenciar si, o en qué medida, la actividad inhibitoria procede de inhibidores de trombina, o bien factor Xa, indirectos o directos.

En el estado de la técnica, este problema se soluciona neutralizándose o reduciéndose la actividad inhibitoria de heparina en ensayos en los que se debe medir inhibidores de trombina, o bien factor Xa, distintos a heparina.

45 En un primer procedimiento conocido se degradan heparinas eventuales contenidas en la muestra mediante la adición de enzimas que degradan heparina, como por ejemplo de heparinasa, para la muestra del paciente. Mediante la actividad de heparinasa se degradan por vía enzimática heparina y todos los derivados de heparina que presentan una secuencia de glucosaminoglucano, mediante lo cual se elimina la actividad inhibitoria indirecta, ocasionada por antitrombina, de heparina. Otros inhibidores directos de trombina, o bien factor Xa, que no presentan ninguna secuencia de glucosaminoglucano, son cuantificables tras un tratamiento previo de la muestra. En la patente US 5 262 325 se describe este principio.

En otro procedimiento para la determinación de inhibidores directos de factor Xa en presencia de heparina se añade

a la muestra un factor Xa conjugado con polietilenglicol, y se determina su inhibición con ayuda de un sustrato cromógeno. El factor Xa conjugado con polietilenglicol se puede inhibir mediante inhibidores directos de FXa, como por ejemplo rivaroxaban, pero no por complejos de antitrombina-heparina. Por lo tanto, el empleo de factor Xa modificado posibilita la determinación específica de inhibidores directos de factor Xa en presencia de heparina (Posterabstract P17-05, Lange, U. et al., A simple and specific assay for direct factor Xa inhibitors in plasma without interference by heparins. Kongressausgabe Hämostaseologie 1/2010).

5

En otro procedimiento conocido para la determinación de inhibidores de factor Xa en presencia de heparina se determina el factor Xa y su inhibición con ayuda de un sustrato cromógeno, y en presencia de sustancias caotropas. Las sustancias caotropas impiden evidentemente la interacción entre antitrombina-heparina, de modo que también este procedimiento es insensible a la acción inhibitoria del factor Xa de heparinas, y por lo tanto es apropiado para la determinación específica de inhibidores directos de factor Xa, como por ejemplo rivaroxaban (Posterabstract P01-17, Samama, M.M. et al., Specific and rapid measurement of rivaroxaban using a new, dedicated chromogenic assay. Kongressausgabe Hämostaseologie 1/2010).

10

Otros métodos conocidos para la neutralización de heparina en muestras de pacientes comprenden la adición de policationes, como bromuro de hexadimetrina (Polybrene®) o de sales metálicas, como sales de cobre o cinc, cuyos iones forman un complejo con heparina.

15

La EP 0 297 597 A2 descubre ya un procedimiento para la determinación de la actividad de inhibidores de serinproteasa. El documento no manifiesta que la carga de reacción se mezcle con un agente que neutraliza el agente oxidante, antes de añadir una cantidad definida de trombina a la carga de reacción.

## 20 Resumen de la invención

La invención en su más amplia forma se define en la reivindicación independiente 1:

procedimiento para la determinación de un inhibidor directo de un factor de coagulación en una muestra, seleccionándose el inhibidor directo del factor de coagulación a partir de grupo de inhibidores directos de trombina hirudina, dabigatran, melagatran, argatroban, ximelagatran, bivalirudin, lepirudin, MCC-977, SSR-182289, TGN-255, TGN-167, ARC-183 y odiparcil, o a partir del grupo de inhibidores directos del factor Xa rivaroxaban, apixaban, o tamixaban, LY 517717, YM 153, DU-176b, DX-9065a y KFA-1982, presentando el procedimiento los siguientes pasos en el orden citado:

25

a) mezclado de la muestra con un agente oxidante para dar una carga de reacción;

b) incubación de la carga de reacción;

30 c) mezclado de la carga de reacción con un agente que neutraliza el agente oxidante;

d) adición de una cantidad definida de factor de coagulación activado trombina o factor Xa a la carga de reacción;

e) determinación de la inhibición del factor de coagulación activado añadido.

En las reivindicaciones dependientes 2-5 se encuentran formas de ejecución preferentes.

## 35 Descripción detallada

La presente invención tomaba como base la tarea de poner a disposición otro procedimiento para la determinación específica de inhibidores del factor de coagulación, que sea insensible frente a heparina y sus derivados, y que se pueda automatizar fácilmente en un sistema de medida de coagulación.

La invención se soluciona mezclándose una muestra, que contiene presumiblemente heparina y uno o varios inhibidores directos de coagulación, en primer lugar con un agente oxidante para dar una carga de reacción, e incubándose y mezclándose a continuación la carga de reacción con un agente que neutraliza el agente oxidante. Esto ocasiona que las interacciones antitrombina-heparina se inhiban, y de este modo se elimina la actividad de heparina, inhibidora de trombina y factor Xa, mediante lo cual se mide específicamente sólo la influencia inhibitoria de inhibidores de coagulación directos según la reivindicación 1 en la subsiguiente determinación de la inhibición de un factor de coagulación activado añadido.

45

La presente invención se refiere, por lo tanto, a un procedimiento para la determinación de un inhibidor directo de un factor de coagulación en una muestra, presentando el procedimiento los siguientes pasos:

- a) mezclado de la muestra con un agente oxidante para dar una carga de reacción;
- b) incubación de la carga de reacción;
- 5 c) mezclado de la carga de reacción con un agente que neutraliza el agente oxidante;
- d) adición de una cantidad definida del factor de coagulación activado a la carga de reacción;
- e) determinación de la inhibición del factor de coagulación activado añadido según la reivindicación 1.

10 El concepto "inhibidor directo de un factor de coagulación" o "anticoagulante directo" se refiere a sustancias no fisiológicas, preferentemente de acción terapéutica, que reducen la actividad del factor de coagulación mediante interacción directa con el factor de coagulación. Inhibidores directos de factores de coagulación, para cuya determinación es apropiado el procedimiento según la invención, son en especial inhibidores directos del factor de coagulación trombina, como por ejemplo hirudina, dabigatran, melagatran, argatroban, ximelagatran, bivalirudin, lepirudin, MCC-977, SSR-182289, TGN-255, TGN-167, ARC-183 y odiparcil, o inhibidores directos del factor de coagulación factor Xa, como por ejemplo rivaroxaban, apixaban, o tamixaban (que se reúnen en la nueva clase de sustancias de xaban), LY 517717, YM 153, DU-176b, DX-9065a und KFA-1982.

20 Los inhibidores directos se deben diferenciar de "inhibidores indirectos" o "anticoagulantes indirectos", que reducen la actividad de un factor de coagulación sólo mediante la interacción con cofactores fisiológicos, como por ejemplo antitrombina o heparina cofactor II. Inhibidores indirectos de factores de coagulación, para los que el procedimiento según la invención es insensible, son especialmente heparinas y sustancias similares a heparinas, que presentan al menos una secuencia de glucosaminoglucano, como por ejemplo heparinas no fraccionadas, de peso molecular elevado (HMWH, UFH), heparinas fraccionadas, de bajo peso molecular (LMWH), derivados de heparina y heparinoides. Derivados de heparina y heparinoides son cadenas de glucosaminoglucano modificadas por vía enzimática y/o química, cuyas propiedades anticoagulatorias se pueden modificar por vía biotecnológica mediante la influencia selectiva de longitud de cadena de glicano, patrón de sulfatado, o bien acetilado, o la mezcla de diferentes glucosaminoglucanos, como por ejemplo danaparoid-sodio, una mezcla de glicosaminoglucanos, que está constituida predominantemente por heparansulfato y en una fracción más reducida por dermatansulfato y condroitinsulfato. También heparinas sintéticas, como el pentasacárido fondaparinux, actúan indirectamente sobre antitrombina. En el sentido de la presente invención, el concepto "heparina" comprende a continuación todas las heparinas, los heparinoides y derivados de heparina citados anteriormente.

30 El concepto "agente oxidante" comprende sustancias que ocasionan la oxidación de aminoácidos, relevantes desde el punto de vista estérico, de inhibidores de serinproteasa plasmáticos, en especial de antitrombina. Mediante la oxidación de aminoácidos relevantes desde el punto de vista estérico se impide el desarrollo de la conformación activa del inhibidor de serinproteasa, y con ello la inhibición del centro activo de serinproteasas, como factor Xa o factor IIa. Agentes oxidantes preferentes son, por ejemplo, hipocloruros y sus sales, a modo de ejemplo hipoclorito sódico o potásico, que son activos en el intervalo de pH neutro. Esto tiene la ventaja de que los analitos a investigar, los inhibidores directos del factor de coagulación, no se degradan debido a valores de pH extremos en la carga de reacción. Frecuentemente participa la metionina en la formación de conformaciones relevantes desde el punto de vista estérico en inhibidores de serinproteasa. Por lo tanto, otros agentes oxidantes preferentes son sustancias del grupo de halógenos reactivos, peróxidos de hidrógeno, ácido peroxomonosulfúrico, ácido peroxodisulfúrico, cloramina B, cloramina T, ácido hipocloroso, N-clorosuccinimida, o sales de las sustancias indicadas anteriormente, que oxidan metionina para dar sulfóxido de metionina, y por consiguiente suprimen la actividad del inhibidor de serinproteasa (véase también Shechter, Y. et. al., Selective oxidation of methionine residues in proteins. Biochemistry 1975, 14(20), 4497-4503).

45 El concepto "agente que neutraliza el agente oxidante" comprende sustancias que neutralizan, es decir, suprimen la actividad oxidativa del agente de oxidación empleado, de modo que éstas no provocarán más interferencias que influyan sobre el principio de medida. Un agente apropiado que neutraliza la actividad oxidativa del agente oxidante es un agente redactor suave. En el más sencillo de los casos, a éstos pertenece un ácido halogenado, preferentemente disoluciones acuosas de bajo peso molecular de cloruros de hidrógeno,

como por ejemplo ácido clorhídrico, que desestabiliza el agente oxidante, de modo que ambos componentes pueden reaccionar por completo en el sistema acuoso. Alternativamente, también se pueden utilizar azúcares de frutas, polioles, ácidos de frutas y sus sales. No son apropiados todos los agentes reductores más fuertes, como por ejemplo ácido bórico, que podrían interferir en los pasos de reacción subsiguientes.

- 5 En el sentido de la invención, se debe entender por una "muestra" el material que contiene presumiblemente el inhibidor de coagulación directo a determinar. El concepto muestra comprende en especial líquidos corporales humanos o animales, particularmente sangre, plasma y suero.

10 El procedimiento según la invención para la determinación de un inhibidor directo de un factor de coagulación comprende, entre otras cosas, el mezclado de la muestra con un agente oxidante para dar una carga de reacción, que se incuba durante un intervalo de tiempo limitado, antes de añadir a la carga de reacción un agente que neutraliza el agente oxidante.

15 El tiempo de incubación de la carga de reacción tras adición del agente oxidante ascenderá al menos a 30 segundos, antes de añadir el agente de neutralización. Preferentemente, la carga de reacción se incuba durante un intervalo de tiempo de aproximadamente 30 a 180 segundos, de modo especialmente preferente durante un intervalo de 90 a 120 segundos.

20 La muestra tratada previamente de este modo se somete entonces a un ensayo de actividad de factor de coagulación convencional, añadiéndose a la muestra tratada previamente según la invención una cantidad definida de aquel factor de coagulación activado para el que es específico el inhibidor directo de coagulación a determinar. En el caso de un procedimiento para la determinación de un inhibidor de trombina directo se añade consecuentemente una cantidad definida de trombina; en el caso de un procedimiento para la determinación de un inhibidor directo del factor Xa se añade una cantidad definida de factor Xa, y se mide la inactivación de la actividad del factor de coagulación añadido, dependiente del inhibidor. Preferentemente se determina la inactivación dependiente del inhibidor de la actividad amidolítica del factor de coagulación añadido con ayuda de un substrato cromógeno, fluorógeno, o marcado de otro modo, que se disocia específicamente del factor de coagulación activado. En el caso del grupo señal disociable de un substrato se puede tratar, por ejemplo, de un colorante determinable en el espectro visible del espectro, un colorante fluorescente, o un colorante determinable en la zona UV. Preferentemente se emplean péptidos que presentan en el grupo carboxi de un resto arginina un resto colorante unido mediante enlace amídico. A tal efecto son especialmente apropiados grupos p-nitroanilida (pNA) y derivados de ácido 5-amino-2-nitrobenzoico (ANBA), así como los colorantes derivados de éstos mediante sustitución, que se pueden cuantificar a 405 nm de longitud de onda tras eliminación de la fracción peptídica mediante una medida fotométrica. La fracción peptídica de un substrato disociable está constituida preferentemente por 3 a aproximadamente 150 restos aminoácidos. En las solicitudes de patente EP 0034122 A1 y US 4,508,644 se describe una pluralidad de sustratos peptídicos cromógenos apropiados, cuya obtención y cuyo empleo se describen en ensayos para el diagnóstico de la coagulación, por ejemplo para la determinación de los factores de coagulación factor IIa (trombina) y Xa.

35 La cantidad de producto de disociación generador de señal liberado, por ejemplo de grupo cromógeno, fluorógeno o amperógeno, presenta comportamiento inversamente proporcional a la actividad, o bien concentración de inhibidor en la muestra. Con ayuda de una curva de calibrado, elaborada a partir de la medida de muestras con actividades de inhibidor conocidas, se puede cuantificar correctamente la cantidad de un inhibidor de coagulación directo en una muestra del paciente.

40 La actividad amidolítica se puede valorar por vía cinética, o como determinación de punto final. En el caso del método cinético se cuantifica la reacción, es decir, la actividad del factor de coagulación remanente, como medida para la actividad de inhibidor presente, por medio de la velocidad de conversión del substrato disociable. En la determinación del punto final se detiene la reacción de disociación tras un tiempo de medida predeterminado, y se mide la cantidad de producto de disociación liberado.

45 Una ventaja especial del procedimiento según la invención consiste en que se diferencia de un procedimiento convencional para la determinación de la actividad de heparina en una muestra únicamente en el tratamiento previo de la muestra, y por lo tanto se puede combinar extraordinariamente con el mismo. De este modo es posible, por

ejemplo, mezclar una primera alícuota de una muestra y una segunda alícuota de la misma muestra, que se mezcló según la invención en primer lugar con un agente oxidante, y a continuación con un agente que neutraliza el agente oxidante, en cada caso con un primer reactivo, que contiene una concentración definida de un factor de coagulación activado, y un segundo reactivo que contiene un sustrato específico para el factor de coagulación, y determinar la inactivación de la actividad del factor de coagulación dado, dependiente del inhibidor. El resultado de ensayo de la primera alícuota no tratada reproduce el potencial anticoagulante total, es decir, la suma de todas las actividades inhibitorias del factor de coagulación de la muestra, incluyendo actividades de heparina eventuales. El resultado de ensayo de la segunda alícuota tratada previamente según la invención representa específicamente, por el contrario, las actividades inhibitorias del factor de coagulación de inhibidores directos del factor de coagulación eventuales en la muestra.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de ensayo para la puesta en práctica del procedimiento según la invención para la determinación de un inhibidor directo de un factor de coagulación en una muestra, conteniendo el kit de ensayo al menos dos reactivos, de los cuales uno comprende un agente oxidante, y el otro un agente que neutraliza el agente oxidante. Los reactivos pueden contener adicionalmente agentes conservantes y ponerse a disposición como reactivos líquidos, o bien como liofilizados. Un kit de ensayo preferente contiene un primer reactivo que comprende hipoclorito sódico como agente oxidante, y un segundo reactivo que comprende ácido clorhídrico como agente de neutralización.

Un kit de ensayo contiene preferentemente otros reactivos de modo adicional, de modo especialmente preferente un reactivo que comprende un factor de coagulación activado, preferentemente trombina o factor Xa, y/o un reactivo que comprende un sustrato para el factor de coagulación activado, que presenta un grupo de señales identificable.

Los reactivos del kit de ensayo según la invención se pueden poner a disposición en forma líquida o liofilizada. Para el caso de que alguno o la totalidad de reactivos del kit de ensayo se presenten como liofilizados, el kit de ensayo puede contener adicionalmente el disolvente necesario para la disolución de los liofilizados, como por ejemplo agua destilada, tampón apropiado o plasma humano standard.

## 25 Descripción de figuras

### Figura 1

Determinación de la inhibición de factor Xa específica de rivaroxaban en muestras que contienen heparina (véase el ejemplo 2).

Curva 1: plasmas de rivaroxaban sin heparina (R0 a R5), sin tratamiento previo según la invención;

30 curva 2: plasmas de rivaroxaban con heparina (R0H a R5H9), sin tratamiento previo según la invención; la inhibición medida es la suma de la inhibición de rivaroxaban y heparina;

curva 3: plasmas de rivaroxaban sin heparina (R0 a R5), con tratamiento previo según la invención;

35 curva 4: plasmas de rivaroxaban con heparina (R0H a R5H), con tratamiento previo según la invención; la inhibición medida corresponde a la inhibición de rivaroxaban (compárese con curvas 1 o 3), la inhibición de heparina se eliminó mediante el tratamiento previo según la invención.

**Ejemplos**

Los siguientes ejemplos de ejecución sirven para ilustrar la invención, y no se deben entender como limitación.

**Ejemplo 1**

5 **Eliminación de la actividad de heparina en muestras mediante adición de un agente oxidante y un agente de neutralización**

**Ejemplo 1a)****Determinación de un inhibidor directo del factor Xa en muestras tratadas previamente según la invención**

10 Se añadieron diversas cantidades de inhibidores directos del factor de coagulación (rivaroxaban como inhibidor directo del factor Xa, argatroban como inhibidor directo de trombina) o inhibidores indirectos del factor de coagulación (pentasacárido fondaparinux [Arixtra®], heparina de peso molecular elevado [HMWH]).

15 Se mezclaron 20 ml de muestra de plasma con 10 ml de un ácido hipocloroso al 0,1 por ciento (hipoclorito sódico) como agente oxidante, y se incubó la carga de reacción a +37°C durante 30 segundos. A continuación se añadieron a la carga de reacción 10 ml de disolución de ácido clorhídrico al 0,1 por ciento para la neutralización del agente oxidante, y se incubó la carga de reacción a +37°C durante 30 segundos. A continuación se añadieron a la carga de reacción 95 ml de reactivo de factor Xa (factor Xa humano, 1 U/ml TRIS tampón, pH 8,0), y se incubó la carga de reacción a +37°C durante 30 segundos. A continuación se añadieron a la carga de reacción 80 ml de un sustrato de factor Xa cromógeno (Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBAmetilamida, 4 mmol/L), y se determinó la reacción del sustrato (en  $\Delta E$ /tiempo) a una longitud de onda de 405 nm en un aparato de medida de coagulación automático (sistema BCS®, Siemens Healthcare Diagnostics).

20 La reducción de la conversión de sustrato en comparación con plasma sin ningún tipo de inhibidor se correlacionó con la cantidad de inhibidor en la muestra.

25 Los resultados se representan en la tabla 1. El tratamiento previo de las muestras según la invención ocasiona una eliminación casi completa de la inhibición del factor Xa mediante inhibidores indirectos, como Arixtra (fondaparinux) o heparina de peso molecular elevado. No obstante, la acción inhibitoria del factor Xa de inhibidores directos, como rivaroxaban no se reduce mediante el tratamiento previo de las muestras según la invención. En muestras que contienen un inhibidor directo de trombina (argatroban) no tiene lugar, así y todo, una inhibición del factor Xa.

**Tabla 1**

30

<b>Plasma</b>		<b><math>\Delta E</math>/min</b>	<b>Inhibición de F Xa</b>
<b>Sin inhibidor</b>		2268	<b>0 %</b>
<b>con inhibidor directo</b>	200 ng/mL rivaroxaban	1296	<b>43 %</b>
	20 mg/mL argatroban	2176	<b>4 %</b>
<b>con inhibidor indirecto</b>	1 mg/mL arixtra	2319	<b>4 %</b>
	4 mg/mL arixtra	2344	<b>3 %</b>
	0,5 U/mL heparina	2353	<b>4 %</b>
	2,0 U/mL heparina	2283	<b>1 %</b>

35

**Ejemplo 1b)**

Determinación de un inhibidor de trombina directo en muestras tratadas según la invención

Se mezclaron 20 ml de muestra de plasma con 10 ml de un ácido hipocloroso al 0,1 por ciento (hipoclorito sódico) como agente oxidante, y se incubó la carga de reacción a +37°C durante 30 segundos. A continuación se añadieron a la carga de reacción 10 µl de disolución de ácido clorhídrico al 0,1 por ciento para la neutralización del agente oxidante, y se incubó la carga de reacción a +37°C durante 30 segundos. A continuación se añadieron a la carga de reacción 140 µl de reactivo de trombina (trombina de vaca, 6 U/ml), y se incubó la carga de reacción a +37°C durante 30 segundos. A continuación se añadieron a la carga de reacción 50 µl de un sustrato de trombina cromógeno (Tos-L-Gly-Pro-Arg-ANBA-isopropilamida, 4 mmol/L), y se determinó la conversión del sustrato (en ΔE/tiempo) a una longitud de onda de 405 nm en un aparato automático de medida de coagulación (sistema BCS®, Siemens Healthcare Diagnostics).

La reducción de la conversión de sustrato en comparación con plasma sin ningún tipo de inhibidor se correlaciona con la cantidad de inhibidor en la muestra.

Los resultados se representan en la tabla 2. El tratamiento previo de las muestras según la invención ocasiona una eliminación casi completa de la inhibición de trombina mediante inhibidores indirectos, como arixtra (fondaparinux) o heparina de peso molecular elevado. No obstante, la acción inhibitoria de trombina de inhibidores directos, como argatroban, no se reduce mediante el tratamiento previo de las muestras según la invención. En muestras que contienen un inhibidor directo del factor Xa (rivaroxaban), no tiene lugar, así y todo, una inhibición de trombina.

**Tabla 2**

Plasma		ΔE/min	Inhibición de trombina
sin inhibidor		2623	0 %
con inhibidor directo	200 ng/mL rivaroxaban	2612	0 %
	20 mg/mL argatroban	140	95 %
	200 mg/mL argatroban	36	99 %
con inhibidor indirecto	1 mg/mL arixtra	2480	5 %
	4 g/mL arixtra	2579	2 %
	0,5 U/mL heparina (HMW)	2533	3 %
	2,0 U/mL heparina (HMW)	2594	1 %

**Ejemplo 2**

Determinación específica del inhibidor directo del factor Xa rivaroxaban en muestras que contienen heparina

Se añadieron a plasma normal humano diversas cantidades de inhibidor del factor Xa rivaroxaban, o bien diversas cantidades del inhibidor directo del factor Xa rivaroxaban, y diversas cantidades del inhibidor indirecto del factor Xa heparina (HMWH) (véase tabla 3).

**Tabella 3**

Muestra	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R0H	R1H	R2H	R3H	R4H	R5H
rivaroxaban (ng/mL)	0	100	200	300	400	500	0	100	200	300	400	500
heparina (U/ml)	0	0	0	0	0	0	0, 4	0, 4	0, 4	0, 4	0, 4	0, 4

Se mezclaron 9 ml de muestra de plasma en primer lugar con 6 ml de agua, y después con 8 ml de un ácido hipocloroso al 0,1 por ciento (hipoclorito sódico) como agente oxidante, y se temperó la carga de reacción a +37°C. A continuación se añadieron a la carga de reacción 8 µl de disolución de ácido clorhídrico al 0,1 por ciento para la neutralización del agente oxidante, y se incubó la carga de reacción a +37°C durante 30 segundos. A continuación se añadieron a la carga de reacción 150 µl de reactivo de factor Xa (factor Xa humano, 1 U/ml en TRIS tampón, pH 8,0), y se incubó la carga de reacción a +37°C durante 120 segundos. A continuación se añadieron a la carga de



reacción 30  $\mu$ l de un sustrato de factor Xa cromógeno (Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBAmetilamida, 4 mmol/l), y se determinó la conversión del sustrato (en  $\Delta E$ /tiempo) a una longitud de onda de 405 nm en un aparato automático de medida de coagulación (sistema BCS®, Siemens Healthcare Diagnostics).

5 Paralelamente se analizaron las muestras sin el tratamiento previo según la invención con ácido hipocloroso al 0,1 por ciento, y con disolución de ácido clorhídrico al 0,1 por ciento, con el procedimiento descrito anteriormente.

La reducción de la conversión de sustrato en comparación con plasma sin ningún tipo de inhibidor se correlaciona con la cantidad de inhibidor en la muestra.

10 Los resultados se representan en la figura 1. El tratamiento previo según la invención de muestras que contienen rivaroxaban y heparina tiene el efecto de medir sólo una inhibición del factor Xa, que corresponde a la inhibición del factor Xa (véase curva 2, sin tratamiento previo, y curva 2, con tratamiento previo). Por lo tanto, el procedimiento según la invención posibilita la determinación específica de la actividad de rivaroxaban en muestras que contienen heparina.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento para la determinación de un inhibidor directo de un factor de coagulación en una muestra, siendo seleccionado el inhibidor directo del factor de coagulación a partir del grupo de inhibidores directos de trombina hirudina, dabigatran, melagatran, argatroban, ximelagatran, bivalirudin, lepirudin, MCC-977, SSR-182289, TGN-255, TGN-167, ARC-183 y odiparil, o a partir del grupo de inhibidores directos del factor Xa rivaroxaban, apixaban, o tamixaban, LY 517717, YM 153, DU-176b, DX-9065a y KFA-19982, presentando el procedimiento los siguientes pasos en el orden citado:
- 5
- a) mezclado de la muestra con un agente oxidante para dar una carga de reacción;
  - b) incubación de la carga de reacción;
  - 10 c) mezclado de la carga de reacción con un agente que neutraliza el agente oxidante;
  - d) adición de una cantidad definida de factor de coagulación activado trombina o factor Xa a la carga de reacción;
  - e) determinación de la inhibición del factor de coagulación activado añadido.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, mezclándose en el paso a) la muestra con un agente oxidante del grupo hipocloruros y sus sales, en especial hipoclorito sódico o potásico, reactivos halógenos, peróxidos de hidrógeno, ácido peroxomonosulfúrico, ácido peroxodisulfúrico, cloramina B, cloramina T, ácido hipocloroso, N-clorosuccinimida, o sus sales.
- 15
- 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, mezclándose en el paso c) la carga de reacción con un agente de neutralización del grupo ácido halogenados, preferentemente disoluciones acuosas de bajo peso molecular de ácidos clorhídricos, de modo especialmente preferente ácido clorhídrico; fructosa; poliol, ácidos de frutas y sus sales.
- 20
- 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, ascendiendo el tiempo de incubación en el paso b) al menos a 30 segundos, preferentemente 30 a 180 segundos, de modo especialmente preferente 90 a 120 segundos.
- 25
- 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, añadiéndose además tras el paso c) a la carga de reacción un substrato cromógeno, fluorógeno, o marcado de otro modo, que se disocia específicamente por el factor de coagulación activado trombina o el factor Xa, y midiéndose la cantidad de producto de disociación liberado que produce la señal.

