

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 766**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2011 E 11192280 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2465942**

54 Título: **Método para la determinación simultánea de varias proteasas de coagulación**

30 Prioridad:

20.12.2010 EP 10195869

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ZANDER, NORBERT

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 550 766 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 la determinación simultánea de varias proteasas de coagulación

La presente invención está en el ámbito del diagnóstico de coagulación y se refiere a un método para la determinación simultánea de la actividad de varias proteasas de coagulación, es decir la determinación simultánea de la inhibición de varias proteasas de coagulación.

Las terapias corrientes de anticoagulación pretenden en primera línea la inhibición de los factores de coagulación que favorecen la coagulación trombina (Factor IIa) y Factor Xa. Se diferencia entre anticoagulación oral con antagonistas de vitamina K, como por ejemplo cumadina, mediante la cual se provoca una inhibición de la síntesis del factor de coagulación, y anticoagulación mediante la inhibición de los factores activos de coagulación en la corriente sanguínea. Los anticoagulantes, los cuales inhiben o bien inactivan los factores activos de coagulación en la corriente sanguínea, se diferencian entre anticoagulantes con efecto directo e indirecto. Los anticoagulantes con efecto indirecto, como por ejemplo Rivaroxaban, Dabigatran o Melagatran se unen a la trombina o al Factor Xa y son con ello altamente específicos. Los anticoagulantes con efecto indirecto, como por ejemplo heparina, se unen a los inhibidores de factor de coagulación endógeno, como por ejemplo antitrombina, y fortalecen en varias veces su efecto de anticoagulación.

Todos los anticoagulantes que inhiben los factores activos de coagulación en la corriente sanguínea, se distinguen por un patrón específico de inactivación. Determinadas categorías de sustancias, como por ejemplo heparina no fraccionada de alto peso molecular, inhiben tanto trombina como también Factor Xa. Otras sustancias actúan de manera altamente específica, inhiben por consiguiente trombina (por ejemplo Hirudin, Dabigatran, Melagatran) o Factor Xa (por ejemplo pentasacáridos como Fondaparinux, Rivaroxaban).

Algunas veces, en el curso del tratamiento de una enfermedad tromboembólica se cambia el anticoagulante. Es clásica la transición de heparina (inhibición de trombina y Factor Xa en la corriente sanguínea) a cumadina (inhibición de la síntesis de factor de coagulación en el hígado) en el tratamiento de trombosis venosa profunda de las piernas. En tales cambios de la terapia puede cambiarse la inactivación relativa de trombina y Factor Xa en la corriente sanguínea. Para el control de la terapia y la dosificación de los medicamentos es importante conocer la actividad o sea la inhibición de trombina y de Factor Xa. De allí que es necesario poder determinar de manera fiable la actividad o bien la inhibición de los factores activos de coagulación trombina y Factor Xa en la sangre de un paciente.

En el diagnóstico de coagulación se diferencian las denominadas pruebas globales para la investigación de la funcionalidad de la cascada de coagulación de la sangre, y las denominadas pruebas individuales para la determinación de la actividad de factores individuales de coagulación de la sangre. Tanto para las pruebas globales como también para las pruebas individuales se conocen diferentes formatos de prueba. En referencia al formato de prueba, se diferencian esencialmente pruebas de coagulación y pruebas cromogénicas.

En una prueba cromogénica se mezcla la muestra de paciente que va a ser investigada, que consiste usualmente en plasma, con un activador de coagulación y con un sustrato para un factor de coagulación. Puesto que la mayoría de factores de coagulación de la sangre son endopeptidasas de serina, por consiguiente hidrolasas, que pueden escindir las uniones peptídicas, se emplean predominantemente sustratos de péptidos, que son escindidos de la manera más específica posible de los factores de coagulación de la sangre que van a ser determinados y que exhiben un grupo de señales detectables. De la forma más preferida se emplean grupos de señal cromogénicos o fluorogénicos, que pueden ser determinados fotométricamente. En los documentos de patente WO 2004/041840 A2, EP 0034122 A1 y US 4, 508, 644 se describe una multiplicidad de sustratos de péptido cromogénicos y su uso en pruebas de diagnóstico de coagulación, por ejemplo para la determinación de los factores de coagulación proteolíticos Factor IIa (trombina) y Xa. En el documento EP 0078764 A1 se describe un método cromogénico para la determinación del factor de coagulación proteolítico XIIIa.

En particular con ayuda de las pruebas cromogénicas pueden determinarse en muestras de pacientes también anticoagulantes, que inhiben la actividad de factores de coagulación de la sangre. Para ello se mezcla la muestra de paciente que va a ser investigada comúnmente con un factor activado de coagulación y con un sustrato para este factor de coagulación. Cuanto más anticoagulante esté presente en la muestra, más fuertemente se inhibe el factor activado de coagulación y menos sustrato es escindido.

Para las pruebas cromogénicas establecidas, también obtenibles comercialmente, se emplean en particular los cromóforos para-nitroanilina (pNA) y ácido 5-amino-2-nitro-benzoico (ANBA), que exhiben un máximo de absorción a 405 nm. Por regla general, el color amarillo que se forma es determinado de manera fotométrica. En la determinación de anticoagulantes, la concentración de color en la carga de prueba se comporta de manera inversamente proporcional a la concentración de anticoagulante en la muestra.

Para poder determinar la inhibición de trombina y Factor Xa, es necesario ejecutar dos pruebas separadas, en las cuales se determina en cada caso la inhibición de uno de los dos factores de coagulación. Sería deseable la determinación simultánea de la actividad o bien inhibición de ambos factores de coagulación en una carga única de prueba. Esto tendría la ventaja de que se reduciría el gasto en material y tiempo y que podrían ejecutarse ambas determinaciones bajo las mismas condiciones, mediante lo cual se evitarían desviaciones en la ejecución de la prueba, como por ejemplo errores en la transferencia con pipeta, que podrían conducir a que pudiera surgir un error de identificación de la relación de ambos resultados.

De allí que la presente invención basó su objetivo en poner a disposición un método que haga posible la determinación simultánea de la inhibición de trombina y Factor Xa en una única carga de prueba. En la WO 2006/072602 A1 se describe un método para la determinación simultánea de trombina y plasmina, una enzima del sistema fibrinolítico, en donde se emplean sustratos fluorescentes. En US 5,510,243 se describe un método cromogénico para la determinación simultánea de diferentes bacterias.

El objetivo en el que se basa la invención se logra mediante la mezcla de una muestra con un primer sustrato cromogénico con especificidad por el primer factor de coagulación proteolítico y con un segundo sustrato cromogénico con especificidad por el segundo factor de coagulación proteolítico y con cantidades definidas del primer y segundo factores de coagulación proteolíticos, en donde el primer sustrato cromogénico exhibe un cromóforo, cuyo máximo de absorción se desvía por lo menos 100 nm del máximo de absorción del cromóforo del segundo sustrato cromogénico. Las señales cromogénicas que surgen pueden ser separadas espectralmente y podrían ser determinadas fotométricamente independientemente una de otra a diferentes longitudes de onda.

El método para la determinación simultánea de la actividad de dos factores proteolíticos de coagulación, que se añaden a la muestra del paciente, es empleado de acuerdo con la invención para analizar el potencial de anticoagulación de un paciente. Para ello se mezcla la muestra del paciente con cantidades definidas de por lo menos dos factores de coagulación proteolíticos que favorecen la coagulación y con los dos sustratos cromogénicos con especificidad por los factores de coagulación añadidos, y se determina la inhibición de la actividad proteolítica de los factores de coagulación. Cuanto mayor es el potencial de anticoagulación del paciente, es decir cuanto más anticoagulante tiene la muestra, más fuertemente inhibido(s) es/son el/los factor(es) de coagulación activados(s) que favorece(n) la coagulación y menor es la escisión de sustrato. La inhibición de la actividad proteolítica de los factores de coagulación puede ser determinada de manera cuantitativa mediante la comparación con una prueba de control, en la cual como muestra se emplea una muestra normal, que no contiene ningún anticoagulante, por ejemplo plasma humano normal.

Cuáles factores activados de coagulación se añaden, depende de cuáles anticoagulantes debieran ser determinados.

Para la determinación de una heparina, es decir una heparina no fraccionada de alto peso molecular (heparina HMW) o una heparina de bajo peso molecular (heparina LMW) o un heparinoide, es adecuada en particular la adición de Factor IIa (trombina) o de Factor Xa. Para la determinación de un inhibidor directo de trombina, por ejemplo de Argatroban, Melagatran, Ximelagatran, Bivalirudin, Dabigatran o Hirudín, es adecuada en particular la adición de Factor IIa (trombina). Para la determinación de un inhibidor directo de Factor Xa, por ejemplo de Rivaroxaban, es adecuada en particular la adición de Factor Xa.

Con ello, es objetivo de la presente invención un método para la determinación del potencial de anticoagulación de un paciente, donde se determina simultáneamente la inhibición de la actividad de un primer y un segundo factores proteolíticos de coagulación, en una única carga de ensayo, en el cual se mezclan una muestra del paciente con un primer sustrato cromogénico con especificidad para el primer factor proteolítico de coagulación y con un segundo sustrato cromogénico con especificidad para el segundo factor de coagulación proteolítico y con cantidades definidas del primer y segundo factores proteolíticos de coagulación y donde se determina de manera fotométrica la inhibición del cambio de absorción en la carga de ensayo (surgimiento de señal de color) y donde el primer sustrato cromogénico exhibe un cromóforo, cuyo máximo de absorción se desvía por lo menos 100 nm del máximo de absorción del cromóforo del segundo sustrato cromogénico.

Bajo el concepto "factor proteolítico de coagulación" se entiende toda proteasa plasmática de serina, que tiene una función de favorecimiento de la coagulación (promotora de coagulación), de anticoagulación (inhibidora de coagulación) o fibrinolítica (de disolución de coágulos) en el sistema de coagulación de la sangre de un mamífero, preferiblemente de humanos. Son por ejemplo factores proteolíticos de coagulación que favorecen la coagulación el Factor IIa (trombina), factor VIIa, factor IXa, factor Xa, factor XIa y factor XIIa. Un factor de coagulación proteolítico de anticoagulación es por ejemplo proteína Ca (proteína C activada). Un factor proteolítico fibrinolítico de coagulación es por ejemplo plasmina.

Bajo el concepto "determinación simultánea" se entiende la determinación de los dos factores de coagulación proteolíticos, en una única carga de ensayo.

En el sentido de la invención se entiende bajo "muestra" el material que presumiblemente contiene los factores de coagulación proteolíticos que van a ser detectados o bien el o los anticoagulantes que van a ser determinados. El concepto de muestra incluye en particular líquidos corporales humanos o animales, primariamente sangre y plasma.

5 Bajo un "sustrato cromogénico con especificidad por un factor de coagulación proteolítico" se entiende un sustrato, que reacciona de manera suficientemente específica con un factor de coagulación proteolítico, donde en la transformación específica de sustrato se libera un cromóforo. En particular, son suficientemente conocidos por los expertos sustratos que pueden ser escindidos, los cuales exhiben por lo menos una posición de escisión para un factor activado de coagulación. Un sustrato que puede ser escindido puede ser una molécula sintética, recombinante o producida por vía biotecnológica o una molécula natural, que se descompone por acción del factor activado proteolítico de coagulación, en dos productos de escisión. Un sustrato que puede ser escindido puede consistir total o parcialmente en un péptido. De la forma más preferida, en el rango de la posición de escisión incluye por lo menos una fracción de péptido. Preferiblemente la fracción de péptido consiste en sustrato que puede ser escindido de 3 a aproximadamente 150 radicales aminoácido. En los documentos de patente EP 0034122 A1 y US 4,508,644 se describe una multiplicidad de sustratos cromogénicos de péptido, su producción y su aplicación en pruebas de diagnóstico de coagulación, por ejemplo para la determinación de los factores de coagulación Factor IIa (trombina) y Xa. En el documento EP 78764 A1 se describe un método cromogénico para la determinación del Factor de coagulación XIIa.

20 Bajo un "cromóforo" se entiende un grupo de señal ("etiqueta"), que puede ser escindido del sustrato por acción de un factor de coagulación proteolítico específico (puede ser disociado) y que después de la escisión del sustrato exhibe otras propiedades de absorción comparadas con las del estado no escindido. De acuerdo con la invención, el primer sustrato cromogénico exhibe un cromóforo, cuyo máximo de absorción después de la escisión se desvía por lo menos 100 nm del máximo de absorción del cromóforo del segundo sustrato cromogénicos después de la escisión. La Tabla 1 muestra una selección de cromóforos conocidos, cuyos máximos de absorción después de la escisión así como combinaciones preferidas de cromóforos, cuyos máximos de absorción se desvían por lo menos 100 nm uno de otro. Son cromóforos preferidos aquellos que después de la escisión del sustrato exhiben un máximo de absorción en el rango visible de longitud de onda de 380 nm a 780 nm.

30 La determinación de la actividad de los factores de coagulación ocurre mediante la determinación fotométrica del cambio de absorción (surgimiento de señal de color) en la carga de ensayo, que se comporta de manera proporcional a la actividad de los factores de coagulación. Bajo el concepto "determinación fotométrica del cambio de absorción" se entiende una medición de la absorción, en la cual se mide la reducción de la intensidad de un rayo de luz, que es transmitido por la carga de ensayo (medición de la transmisión). Para medir el surgimiento de la señal de color, se elige un rango de longitud de onda, el cual es absorbido por el cromóforo disociado que va a ser determinado.

35 De acuerdo con la invención, la determinación fotométrica del cambio de absorción incluye la medición de absorción de la carga de ensayo en por lo menos dos longitudes de onda diferentes, que están preferiblemente en el rango del máximo de absorción de los cromóforos empleados. De modo alternativo, la carga de ensayo puede ser irradiada con luz blanca, que se descompone espectralmente después del paso a través de la carga de ensayo. La medición del cambio de absorción de la carga de ensayo a lo largo del tiempo puede ocurrir mediante pulsos de luz que se derivan en cortos intervalos de tiempo de las longitudes de onda, que corresponden a los máximos de absorción de los dos cromóforos empleados.

Tabla 1

| Cromóforo | Máximo de absorción | Combinado con |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| para-Nitroanilina (pNA) | 405 nm | Colour Index Azul Básico 49 o 124 |
| Ácido 5-amino-2-nitro-benzoico (ANBA) | 405 nm | Colour Index Azul Básico 49 o 124 |
| Colour Index Azul Básico 49 | 625 nm | pNA, ANBA |
| Colour Index Azul Básico 124 | 625 nm | pNA, ANBA |

45 Son cromóforos particularmente preferidos derivados de fenoxazim, como por ejemplo Colour Index Azul Básico 49 (C.I. Azul Básico 49, número de registro CAS 11075-19-7) o Colour Index Azul Básico 124 (C.I. Azul Básico 124, CAS número de registro 89106-91-2), que exhiben un máximo de absorción de aproximadamente 600 nm y causan

una coloración azul. En el documento de patente EP 0258784 A2 se manifiestan derivados de fenoxazim o bien los correspondientes sustratos de péptido etiquetados particularmente preferidos.

5 Puede emplearse otro método para la determinación simultánea de la actividad de dos factores de coagulación proteolíticos, que están presentes en la muestra de paciente, para investigar el estado de coagulación de un paciente. Para ello se mezcla comúnmente la muestra antes de la adición de los dos sustratos cromogénicos, con uno o varios agentes que provocan una activación directa o indirecta de los factores de coagulación proteolíticos que van a ser determinados. Se entiende por activación directa, que se usa un agente que activa directamente al factor de coagulación proteolítico que va a ser determinado, independientemente de la presencia de otros factores de coagulación. Se entiende por activación indirecta, que se emplea un agente que activa uno o varios factores de coagulación de la sangre de la cascada de coagulación de la sangre, los cuales nuevamente activan el factor de coagulación proteolítico que va a ser investigado. El tipo de agente depende de cuál factor de coagulación debiera ser determinado, si debiera determinarse la actividad del factor de coagulación solo o si debiera determinarse la funcionalidad de la cascada de coagulación de la sangre o un rango parcial de la cascada de coagulación de la sangre (ruta extrínseca o intrínseca) en virtud de un factor de coagulación. Las sustancias y mezclas específicas de diferentes sustancias, que hacen posible una activación directa o indirecta de factores proteolíticos de coagulación, son suficientemente conocidos por los expertos y abarcan por ejemplo fosfolípidos como por ejemplo fosfolípidos con carga negativa; lipoproteínas, como por ejemplo tromboplastina; proteínas, como por ejemplo factor de tejido, proteasas de serina activadas, como por ejemplo Factor IIa (trombina), Factor VIIa, Factor IXa, Factor Xa, Factor XIa, Factor XIIIa o proteína C activada; veneno de serpiente, como por ejemplo enzima PROTAC®, Ecarin, Textarin, Noscarin, Batroxobin, Trombocitina o veneno de víbora de Russell (RVV); activadores de contacto, como por ejemplo sílica, caolín, ácido elálgico o celita. Otras sustancias que pueden contener un agente de activación, como por ejemplo sustancias amortiguadoras, sales, detergentes, iones, en particular iones calcio y formadores de quelatos.

25 En una forma de ejecución, puede añadirse a la carga de ensayo además un inhibidor de la agregación de fibrina. Se entiende por un inhibidor de agregación de fibrina, una sustancia, en particular un oligopéptido sintético que inhibe la colocación mutua (polimerización) de los monómeros de fibrina, que surgen bajo la acción de trombina y con ello impide una formación de coágulos en la mezcla de reacción, que podrían interferir la determinación fotométrica de la señal de color (ver por ejemplo EP 0456152 B1).

30 La presente invención se refiere además a un kit de ensayo para la determinación del potencial de anticoagulación de una muestra de paciente. Un kit de ensayo de acuerdo con la invención consiste en un primer reactivo con una concentración definida de un primer factor de coagulación proteolítico, y un segundo reactivo con una concentración definida de un segundo factor de coagulación proteolítico, y

35 a) un tercer reactivo que contiene un primer sustrato cromogénico con especificidad por el primer factor de coagulación proteolítico y un segundo sustrato cromogénico con especificidad por el segundo factor de coagulación proteolítico; o

b) un tercer reactivo que contiene un primer sustrato cromogénico con especificidad por el primer factor de coagulación proteolítico y un cuarto reactivo que contiene un segundo sustrato cromogénico con especificidad por el segundo factor de coagulación proteolítico,

40 donde el primer sustrato cromogénico exhibe un cromóforo, cuyo máximo de absorción se desvía por lo menos 100 nm del máximo de absorción del cromóforo del segundo sustrato cromogénico.

En un kit de ensayo preferido, el primer sustrato cromogénico con especificidad por el primer factor de coagulación proteolítico exhibe un cromóforo del primer grupo para-nitroanilina y ácido 5-amino-2-nitro-benzoico, y el segundo sustrato cromogénico con especificidad por el segundo factor de coagulación proteolítico exhibe un cromóforo del grupo de los derivados de fenoxazim, o al revés.

45 Un kit de ensayo particularmente preferido incluye un primer reactivo con una concentración definida de trombina y un segundo reactivo con una concentración definida de Factor Xa y por lo menos otro reactivo que contiene un sustrato cromogénico específico de trombina y/o un sustrato cromogénico específico de Factor Xa, donde el sustrato cromogénico específico de trombina exhibe un cromóforo, cuyo máximo de absorción se desvía por lo menos 100 nm del máximo de absorción del cromóforo del sustrato cromogénico específico del Factor Xa. Los dos sustratos pueden estar contenidos en un único reactivo o estar presentes en reactivos separados. De modo preferido, el sustrato cromogénico específico de trombina exhibe un cromóforo del grupo para-nitroanilina y ácido 5-amino-2-nitro-benzoico, y el sustrato cromogénico específico de Factor Xa exhibe un cromóforo del grupo de los derivados de fenoxazim, o al revés.

55 Los reactivos del kit de ensayo de acuerdo con la invención pueden estar preparados en forma líquida o liofilizada. Para el caso en que uno o todos los reactivos del kit de ensayo estén presentes como liofilizados, el kit de ensayo

puede adicionalmente el solvente necesario para la disolución de los liofilizados, como por ejemplo agua destilada o amortiguador adecuado.

Descripción de las figuras

Figura 1

5 Diagrama de barras de la inhibición de [%] de actividad de Factor Xa en muestras de plasma normal enriquecidas con Rivaroxaban y/o Argatroban en diferentes concentraciones (ver Ejemplo 2). Se midió la escisión del sustrato de péptido específico de Factor Xa con cromóforo ANBA a una longitud de onda de 405 nm. Independientemente de la concentración del Argatroban (inhibidor de trombina), en muestras con aumento en la concentración de Rivaroxaban (inhibidor de Factor Xa) se mide un aumento en la inhibición de Factor Xa.

10 Figura 2

15 Diagrama de barras de la inhibición de la actividad de trombina [%] en muestras de plasma normal enriquecidas con Rivaroxaban y/o Argatroban en diferentes concentraciones (ver Ejemplo 2). Se midió la escisión del sustrato de péptido específico de trombina con cromóforo Azul Básico 49 a una longitud de onda de 575 nm. Independientemente de la concentración del Rivaroxaban (inhibición de Factor Xa) en muestras con aumento en la concentración de Argatroban (inhibidor de trombina) se mide un aumento en la inhibición de trombina.

Los siguientes ejemplos de ejecución sirven para la ilustración del método de acuerdo con la invención y no deben entenderse como limitantes.

Ejemplos

20 **Ejemplo 1:** Determinación simultánea de la actividad de trombina y del Factor Xa en plasma sanguíneo en una carga única de reacción

Se mezclaron los siguientes componentes para dar una carga de reacción:

| | | |
|----|--------|---|
| 10 | 10 µL | Muestra |
| | 10 µL | Conjunto de plasma humano normal |
| 25 | 40 µL | Reactivo de sustrato (Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-metilamida 4 mM, Tos-Gly-Pro-Arg-Azul Básico 49 0,8 mM en amortiguador de manitol, pH 4.0) |
| | 100 µL | Reactivo de Factor Xa (Factor Xa humano 0,75 U/mL en TRIS 4,5 g/L, NaCl 9 g/L, EDTA 0,56 g/L, pH 8.0) |
| | 100 µL | Reactivo de Trombina (Trombina bovina 5 U/mL en TRIS 1,2 g/L, pH 8.2) |

30 Como muestra se empleó plasma humano normal. Factor Xa escindió ANBA del sustrato de péptido específico de Factor Xa Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-metilamida, lo cual causó un incremento en la densidad óptica durante el tiempo en la carga de reacción, a una longitud de onda de 405 nm. Al mismo tiempo escindió trombina Azul Básico 49 del sustrato de péptido específico de trombina Tos-Gly-Pro-Arg-Azul Básico 49, lo cual causó un incremento en la densidad óptica durante el tiempo en la carga de reacción, a una longitud de onda de 575 nm.

35 Las mediciones de las densidades ópticas de la carga de reacción a 405 nm y 575 nm así como la evaluación de las cinéticas de reacción fueron ejecutadas de manera simultánea, en un aparato para analizar coagulación completamente automático Sysmex® CS-2000i. Para la medición de las densidades ópticas se irradió la carga de reacción de manera alternante con luz de las longitudes de onda previamente mencionadas, y en función de las longitudes de onda y el tiempo se determinó la extinción de la luz, causada por la coloración de la carga de reacción.

40 Las elevaciones de las cinéticas de reacción tienen correlación con las respectivas actividades enzimáticas. Para una muestra de plasma normal, el cambio de extinción específico del Factor Xa a 405 nm fue de 0,236 por minuto, mientras el cambio en la extinción específico de trombina a 575 nm fue de 0,111 por minuto.

Ejemplo 2: Determinación simultánea de inhibidores de trombina y Factor Xa en una única carga de reacción

ES 2 550 766 T3

Se enriqueció plasma normal con diferentes concentraciones de Rivaroxaban, un inhibidor específico de Factor Xa, y/o de Argatroban, un inhibidor específico de trombina, y se empleó como muestra en un método según el Ejemplo 1.

- 5 Las elevaciones de las cinéticas de reacción para plasma normal sin inhibidores se definieron como 100 % de la respectiva actividad enzimática. Mediante esta referencia, se evaluaron los resultados de las muestras de plasma con diferentes concentraciones de inhibidor. En la Tabla 2 se resumen los resultados (inhibición en %).

Tabla 2

| Rivaroxaban (ng/mL) | Argatroban (ng/mL) | [%] de inhibición F Xa | [%] de inhibición Trombina |
|---------------------|--------------------|------------------------|----------------------------|
| 0 | 0 | 2 | 0 |
| 0 | 375 | 1 | 18 |
| 0 | 750 | 0 | 31 |
| 125 | 0 | 42 | 0 |
| 125 | 375 | 40 | 23 |
| 125 | 750 | 39 | 33 |
| 250 | 0 | 65 | 5 |
| 250 | 375 | 62 | 22 |
| 250 | 750 | 63 | 35 |

- 10 Los resultados muestran que el empleo de dos sustratos cromogénicos con diferentes especificidades enzimáticas y con cromóforos que exhiben diferentes máximos de absorción, hace posible la determinación simultánea, independiente de inhibidores con especificidad para diferentes factores de coagulación, en una única carga de reacción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la determinación del potencial de anticoagulación de un paciente, en donde se determina simultáneamente la inhibición de la actividad de un primer y un segundo factores proteolíticos de coagulación en una única carga de ensayo, en el cual se mezcla una muestra del paciente con un primer sustrato cromogénico con especificidad por el primer factor de coagulación proteolítico y con un segundo sustrato cromogénico con especificidad por el segundo factor de coagulación proteolítico y con cantidades definidas del primer y del segundo factor de coagulación proteolítico y en donde se determina fotométricamente la inhibición del cambio de absorción en la carga de ensayo, **caracterizado porque** el primer sustrato cromogénico exhibe un cromóforo cuyo máximo de absorción se desvía por lo menos 100 nm del máximo de absorción del cromóforo del segundo sustrato cromogénico.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en donde el primero y el segundo factores proteolíticos de coagulación son elegidos de entre el grupo de trombina, Factor VIIa, Factor IXa, Factor Xa, Factor XIa, Factor IIa, proteína Ca y plasmina.
- 15 3. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el primero o segundo factor proteolítico de coagulación es trombina.
4. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el primero o segundo factor proteolítico de coagulación es Factor Xa.
5. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el primero o segundo sustrato cromogénico exhibe como cromóforo para-nitroanilina o ácido 5-amino-2-nitro-benzoico.
- 20 6. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el primero o segundo sustrato cromogénico exhibe como cromóforo un derivado de fenoxazim.
7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde mediante la inhibición del cambio de absorción, se determina la concentración de anticoagulante en la muestra.
- 25 8. Kit de prueba consistente en un primer reactivo con una concentración definida de un primer factor de coagulación proteolítico, y un segundo reactivo con una concentración definida de un segundo factor de coagulación proteolítico, y
- a. un tercer reactivo que contiene un primer sustrato cromogénico con especificidad por el primer factor de coagulación proteolítico y un segundo sustrato cromogénico con especificidad por el segundo factor de coagulación proteolítico; o
- 30 b. un tercer reactivo que contiene un primer sustrato cromogénico con especificidad por el primer factor de coagulación proteolítico y un cuarto reactivo que contiene un segundo sustrato cromogénico con especificidad por el segundo factor de coagulación proteolítico,
- en donde el primer sustrato cromogénico exhibe un cromóforo, cuyo máximo de absorción se desvía por lo menos 100 nm del máximo de absorción del cromóforo del segundo sustrato cromogénicos.
- 35 9. Kit de prueba según la reivindicación 8, en donde el primer factor proteolítico de coagulación es trombina.
10. Kit de prueba según una de las reivindicaciones 8 o 9, en donde el segundo factor proteolítico de coagulación es Factor Xa.
- 40 11. Kit de prueba según una de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el primer sustrato cromogénico con especificidad por el primer factor de coagulación proteolítico exhibe un cromóforo del grupo de para-nitroanilina y ácido 5-amino-2-nitro-benzoico y el segundo sustrato cromogénico con especificidad por el segundo factor de coagulación proteolítico exhibe un cromóforo del grupo de los derivados de fenoxazim, o al revés.

FIG 1

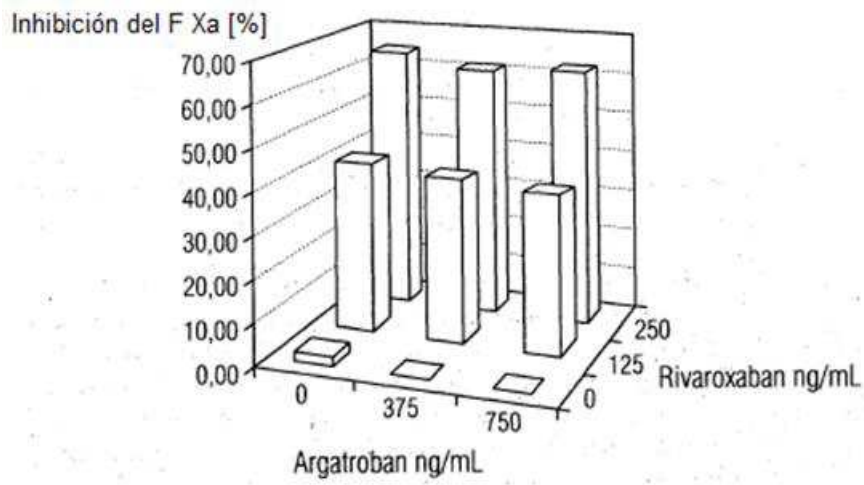


FIG 2

