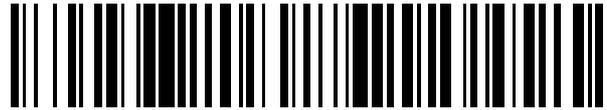


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 106**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2011 E 11178962 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2423687**

54 Título: **Kit de reactivos para detectar un anticoagulante lúpico y método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico**

30 Prioridad:

26.08.2010 JP 2010189708

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

06.06.2016

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)
5-1, Wakinohama-Kaigandori 1-chome, Chuo-ku
Kobe-shi, Hyogo 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

**OKUDA, MASAHIRO;
YOSHIDA, KAZUYO y
KUMANO, OSAMU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 573 106 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

Kit de reactivos para detectar un anticoagulante lúpico y método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un kit de reactivos para detectar un anticoagulante lúpico que es uno de los anticuerpos responsables del síndrome antifosfolipídico y además se refiere a un método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico en un espécimen que se obtiene de un sujeto.

10

Antecedentes

Síndrome antifosfolipídico (al que se hace referencia de aquí en adelante como "APS") es una expresión general para un grupo de enfermedades que tienen anticuerpos antifosfolipídicos en la sangre y que presentan síntomas clínicos tales como trombosis arteriovenosa y aborto habitual (Mika Yoshida et al., The Japanese Society for Laboratory Hematology, 2008, 9(1):69-76). Anticuerpos antifosfolipídicos (a los que se hace referencia de aquí en adelante como "aPL") es una expresión general para los anticuerpos que se unen a fosfolípidos o a un complejo de fosfolípidos y proteínas (Tatsuya Atsumi et al., The Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, 2008, 19(3):329-332).

15

20

Existen varios anticuerpos aPL y los nombres de estos anticuerpos se dan según los fosfolípidos que reconocen los anticuerpos y las proteínas de unión a los fosfolípidos. Ejemplos de aPL incluyen anticuerpos anti-cardiolipina (aCL), anticuerpos anti-glucoproteína I β 2 (a β 32GPI), anticuerpos anti-protrombina dependientes de fosfatidilserina (aPS/PT), y anticoagulante lúpico (al que de aquí en adelante también se hace referencia como "LA"). Los aCL, a β GPI, y aPS/PT se detectan por un inmunoensayo enzimático (ELISA) y el LA se detecta por prolongación del tiempo de coagulación dependiente de fosfolípidos (Masahiro Ieko et al., The Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, 2007, 18(3):226-233).

25

El LA se define como "una inmunoglobulina que inhibe las reacciones de coagulación dependientes de fosfolípidos sin inhibir las actividades individuales de los factores de coagulación. También se considera que el LA es un autoanticuerpo que inhibe en sí mismos a los fosfolípidos de las reacciones de coagulación que dependen de fosfolípidos.

30

Actualmente la inspección convencional de LA es de la siguiente manera:

35

- 1) La prolongación del tiempo de coagulación se observa en la exploración por inspección midiendo los tiempos de coagulación que depende de fosfolípidos tales como el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), tiempo con veneno de víbora de Russel diluido (dRVVT), y tiempo de coagulación con caolín (KCT);
- 2) La prolongación del tiempo de coagulación no mejora incluso si se lleva a cabo un ensayo de mezcla con plasma sanguíneo de donantes sanos;
- 3) se confirma que el tiempo de coagulación se acorta añadiendo un exceso de fosfolípidos (ensayo para evaluar la dependencia de fosfolípidos).

40

Finalmente, se diagnostica un sujeto que es positivo a LA excluyendo anomalías de coagulación obvias tales como por inhibidores de los factores de coagulación y la influencia de anticoagulantes tales como heparina (véase Mika Yoshida et al., The Japanese Society for Laboratory Hematology, 2008, 9(1):69-76).

45

Uno de los ensayos para evaluar la dependencia del LA a los fosfolípidos es un método para evaluar la presencia de LA en un espécimen que incluye las etapas de: medir el tiempo de coagulación utilizando un reactivo de medición del tiempo de coagulación que contenga una baja concentración de fosfolípidos y un reactivo de medición de la coagulación que contenga una alta concentración de fosfolípido; y confirmar la prolongación del tiempo de coagulación que depende de la concentración de fosfolípidos basándose en la relación de los tiempos de coagulación que se obtienen con los reactivos.

50

55

Los presentes inventores han completado un kit de reactivos capaz de detectar el LA con alta sensibilidad ajustando la composición de fosfolípidos que contiene un reactivo (véase los documentos US2004091952, US2005175983, y la Patente Japonesa N° 4467407).

Sumario de la invención

60

El ámbito de la presente invención se define solamente por las reivindicaciones adjuntas, y no está afectado en ningún grado por lo que se establece en el presente sumario.

Aunque se puede detectar el LA por los métodos anteriores, la prolongación del tiempo de coagulación se puede observar incluso si se utiliza el reactivo que contiene una alta concentración de fosfolípidos. Es decir, en el caso de

65

que se utilicen los métodos convencionales, incluso una relación de tiempo de coagulación en un espécimen positivo a LA puede ser igual que el de un espécimen negativo. Por lo tanto es difícil separar claramente un grupo de especímenes positivos a LA de un grupo de especímenes negativos a LA.

5 Los presentes inventores han descubierto que la prolongación del tiempo de coagulación por LA se puede suprimir utilizando un reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene sales de manganeso de forma que el grupo de especímenes positivos a LA puede separarse claramente del grupo de especímenes negativos a LA y se ha completado la presente invención.

10 Es decir, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un kit de reactivos para detectar anticoagulante lúpico que incluye un primer reactivo de medición de la coagulación que contiene una sal de manganeso y un segundo reactivo de medición de la coagulación que contiene la sal de manganeso a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o no contiene sal de manganeso.

15 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico que incluye las etapas de:

mezclar un espécimen que se obtiene de un sujeto con el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de manganeso para medir el primer tiempo de coagulación;
 20 mezclar el espécimen con el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de manganeso a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o no contiene una sal de manganeso para medir el segundo tiempo de coagulación; y
 determinar si el anticoagulante lúpico está contenido en el espécimen basándose en el primer y el segundo tiempo de coagulación que se miden.

25 De acuerdo con el kit de reactivo para detectar el LA de la presente invención, se suprime la prolongación del tiempo de coagulación por el LA de forma que el grupo de especímenes positivos a LA se puede separar claramente del grupo de especímenes negativos a LA. De acuerdo con el método de determinación de la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de la presente invención, se puede determinar con precisión si el LA está contenido en el
 30 espécimen que se obtiene del sujeto.

Breve descripción de los dibujos

35 La Fig. 1 es un gráfico que muestra un valor medio de las relaciones de tiempos de coagulación que se obtienen midiendo especímenes LA utilizando un reactivo para detectar LA que contiene varios tipos de sales metálicas; y
 La Fig. 2 es un diagrama de dispersión de la relación Lupus que implica reactivos que contienen una sal de manganeso o no, que se ha calculado a partir del espécimen negativo a LA y el espécimen positivo a LA.

40 Descripción detallada de las realizaciones específicas

El kit de reactivos para detectar el LA de la presente invención (al que se hace referencia a partir de ahora como “kit de reactivos de la presente invención”) incluye el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de manganeso y un segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal
 45 de manganeso a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o no contiene una sal de manganeso.

La sal de manganeso contenida en el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación del kit de reactivos de la presente invención no se limita particularmente siempre que sea una sal de manganeso que forme iones de manganeso (Mn²⁺) en un disolvente adecuado, preferentemente un tampón que puede estar contenido en
 50 cada reactivo. Ejemplos de la sal de manganeso incluyen cloruro de manganeso, acetato de manganeso, carbonato de manganeso, sulfato de manganeso. La sal de manganeso puede ser un anhídrido o puede ser un hidrato.

La concentración de sal de manganeso en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación es de 0,1 a 5
 55 mM, preferentemente de 0,5 a 2 mM, más preferentemente de 0,5 a 1 mM. El segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación no necesita contener la sal de manganeso. Cuando el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene la sal de manganeso, la concentración de la sal de manganeso en el mismo es preferentemente menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación. Por ejemplo, cuando la concentración de sal de manganeso en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación es de 1 mM, la
 60 concentración de sal de manganeso en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede establecerse en 0,1 mM.

En el kit de reactivos de la presente invención, una relación de concentración de sal de manganeso en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación con respecto al primer reactivo de medición del tiempo de
 65 coagulación ([concentración de sal de manganeso del segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación]/[concentración de sal de manganeso del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación]) es de 0 a 0,2.

En el kit de reactivos de la presente invención, es preferible que el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación contenga fosfolípidos y el segundo reactivo de medición del tiempo contenga fosfolípidos a una concentración menor que la del primer reactivo de medición de la coagulación con el fin de facilitar la coagulación.

5 Ejemplos del fosfolípido incluyen fosfatidiletanolamina (a la que también se hace referencia de aquí en adelante como PE), fosfatidilcolina (a la que también se hace referencia de aquí en adelante como PC), y fosfatidilserina (a la que también se hace referencia de aquí en adelante como PS). El primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contienen al menos una que se selecciona de entre PE, PC, y PS, preferentemente dos tipos de las mismas, más preferentemente todos los tipos de fosfolípidos.

10 El fosfolípido contenido en el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede ser un fosfolípido de origen natural o un fosfolípido sintético. Entre ellos, se prefiere que el fosfolípido sintético o el fosfolípido de origen natural tenga una pureza del 99% o más, desde el punto de vista de la mejora de la detección de LA. Las cadenas laterales de ácidos grasos de PE, PC, y PS no se limitan particularmente y ejemplos de los mismos incluyen ácido palmítico, ácido oleico, y ácido esteárico. Entre ellos, se prefiere el ácido oleico.

15 El contenido de fosfolípidos en el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación cuando se mezclan cantidades equivalentes de un espécimen con el primer o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación (por ejemplo, mezclando 50 μ l del espécimen y 50 μ l del primer o el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación) y se mide el tiempo de coagulación, es de la siguiente manera. La concentración de fosfolípido en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación es de 100 a 2000 μ g/ml, preferentemente de 100 a 600 μ g/ml. La concentración de fosfolípido en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación es desde 20 a 100 μ g/ml, preferentemente desde 30 a 70 μ g/ml.

25 En el caso que se ha descrito anteriormente, cuando el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contienen PE, PC, y PS como fosfolípidos, la concentración de PE en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación es desde 30 a 700 μ g/ml, preferentemente desde 40 a 300 μ g/ml. La concentración de PC es desde 50 a 1000 μ g/ml, preferentemente desde 60 a 500 μ g/ml, y la concentración de PS es desde 5 a 300 μ g/ml, preferentemente desde 10 a 150 μ g/ml. La concentración de PE en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación es desde 1 a 100 μ g/ml, preferentemente desde 10 a 80 μ g/ml. La concentración de PC es desde 5 a 200 μ g/ml, preferentemente de 20 a 150 μ g/ml. La concentración de PS es desde 1 a 100 μ g/ml, preferentemente desde 3 a 50 μ g/ml.

35 Cuando la relación de mezcla de un espécimen y el primer o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación no es 1:1, la concentración final de fosfolípidos en una mezcla del espécimen y el primer o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación se puede ajustar de forma que sea la misma que en una mezcla en la que se utilizan los reactivos que tienen las concentraciones de fosfolípidos.

40 En el kit de reactivos de la presente invención, el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación pueden contener además otros componentes necesarios para producir la coagulación *in vitro*. Ejemplos de otros componentes incluyen un activador, veneno de serpiente, un factor tisular, y sales de calcio.

45 Como activador, se utiliza preferentemente al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido elálgico, caolín, cerita, y sílice. El ácido elálgico puede estar en un estado en el que se formen iones metálicos y quelatos.

Como veneno de serpiente, se utiliza preferentemente al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en veneno de Russel, veneno textarina, y veneno ecarina.

50 Como factor tisular, se utiliza preferentemente uno derivado de cerebro de conejo, derivado de placenta humana, o uno recombinante.

55 Los otros componentes anteriores se seleccionan adecuadamente dependiendo del método de medición del tiempo de coagulación del espécimen. Por ejemplo, cuando se mide el tiempo de coagulación basándose en el principio de un tiempo de tromboplastina parcial activada, el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación pueden contener un activador y sales de calcio. Cuando el tiempo de coagulación se mide basándose en el principio del tiempo de veneno de víbora de Russel, el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación pueden contener veneno de serpiente y sales de calcio. Cuando el tiempo de coagulación se mide basándose en el principio del tiempo de protrombina, el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación pueden contener un factor tisular y sales de calcio.

60 Cuando el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contienen caolín y sales de calcio y el tiempo de coagulación se mide basándose en el principio de un tiempo de coagulación de caolín, los fosfolípidos endógenos contenidos en el espécimen se utilizan para la reacción de coagulación. Por lo tanto, el primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación no necesitan contener los fosfolípidos que se han descrito anteriormente.

En el kit de reactivos de la presente invención, el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación pueden contener un tampón que tiene una acción tampón en un intervalo de pH de 5 a 10, preferentemente en un intervalo de pH de 6 a 9. Ejemplos del tampón incluyen el ácido 4-(2-hidroximetil) piperacina-1-il-etano sulfónico (HEPES), tris (hidroximetil) aminometano (Tris), y tampón fosfato (PBS).

La concentración de tampón en los reactivos puede estar en el intervalo que se utiliza en general en el campo de la química clínica, y se determina empíricamente basándose en experimentos simplificados y repetidos.

El primer reactivo de medición del tiempo de coagulación del kit de reactivos de la presente invención puede ser una mezcla en forma de solución o suspensión que contiene una sal de manganeso y el fosfolípido y/u otros componentes en el tampón. Además, el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede ser una mezcla en forma de solución o suspensión que contiene el fosfolípido y/u otros componentes en el tampón y contiene o no contiene una sal de manganeso.

El kit de reactivos de la presente invención puede contener además un tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de calcio. La concentración de la sal de calcio en el tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación no está particularmente limitada siempre que esté a una concentración suficiente para el inicio de la coagulación en la mezcla del espécimen y el primer o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación y es preferentemente desde 10 a 40 mM. La sal de calcio no está particularmente limitada siempre que sea una sal de calcio que forme iones de calcio (Ca^{2+}) en un disolvente adecuado, preferentemente en un tampón que puede estar contenido en cada reactivo, y ejemplos de las mismas incluyen el cloruro cálcico.

El kit de reactivos de la presente invención puede ser una forma combinada del primer o segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación y el tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación. Es decir, en el kit de reactivos de la presente invención, el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación puede estar comprendido por el primer reactivo parcial que contiene la sal de manganeso y el segundo reactivo parcial que contiene la sal de calcio, el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación puede estar compuesto por el tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene la sal de manganeso a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o no contener sal de manganeso y un cuarto reactivo parcial que contiene una sal de calcio.

De aquí en adelante, se describirá el método de determinación de la presencia o ausencia de LA en un espécimen (al que también se hace referencia como método de la presente invención). En el método de la presente invención, se utiliza adecuadamente el kit de reactivos para detectar LA de la presente invención.

En el método de la presente invención, se mezcla primero un espécimen obtenido de un sujeto con el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de manganeso y se mide el primer tiempo de coagulación.

El espécimen que se utiliza en la medición es sangre que se obtiene del sujeto, preferentemente plasma sanguíneo que se obtiene a partir de la sangre, más preferentemente plasma sanguíneo tras retirar las plaquetas. Además preferentemente, se utiliza como espécimen una mezcla de plasma sanguíneo del sujeto y plasma de sangre normal o plasma de sangre normal al que se han quitado las plaquetas. La utilización de una mezcla que contiene plasma sanguíneo normal como muestra es ventajoso para evitar la prolongación del tiempo de coagulación que resulta de la deficiencia de coagulación así como para mejorar la sensibilidad de detección en un ensayo de detección de un trastorno de coagulación dependiente de fosfolípidos. La relación de la mezcla del plasma sanguíneo del sujeto con respecto al plasma sanguíneo normal generalmente varía de 4:1 a 1:4, y preferentemente es de 1:1.

En el método de la presente invención, el espécimen se divide en dos partes. Una se utiliza para medir el primer tiempo de coagulación y el otro se utiliza para medir el segundo tiempo de coagulación.

Uno de los dos especímenes divididos se mezcla con el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación. Cuando el reactivo está compuesto por el primer reactivo parcial y el segundo reactivo parcial, el espécimen puede mezclarse con una mezcla del primer reactivo parcial y el segundo reactivo parcial, o una mezcla del espécimen y el primer reactivo parcial (o el segundo reactivo parcial) se puede mezclar con el segundo reactivo parcial (o el primer reactivo parcial).

La relación de la mezcla (relación de volumen) del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación respecto al espécimen puede ser desde aproximadamente 4:1 a 1:4, preferentemente de 1:1.

Cuando el primer reactivo parcial y el segundo reactivo parcial se añaden por separado al espécimen, una mezcla del espécimen y el reactivo parcial se puede inocular tras añadir el primer reactivo parcial (o el segundo reactivo parcial) o antes de añadir el segundo reactivo parcial (o el primer reactivo parcial), si fuera necesario. El tiempo de incubación puede ser desde aproximadamente 1 a 10 minutos y la temperatura puede ser desde aproximadamente la temperatura ambiente a 45 °C.

El espécimen y el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación se mezclan de dicha manera y luego se mide el primer tiempo de coagulación. El método para medir el tiempo de coagulación puede ser un método conocido en la técnica, y se puede medir, por ejemplo, utilizando un analizador automático conocido.

5 Luego el espécimen se mezcla con el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de manganeso a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación o no contiene sal de manganeso, y se mide el segundo tiempo de coagulación.

10 El segundo tiempo de coagulación se mide mezclando el otro de los dos especímenes divididos con el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación. Más particularmente, el proceso de medición se lleva a cabo de la misma manera que se describe en la medición del primer tiempo de coagulación excepto que el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación se utiliza en lugar del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación.

15 El primer y segundo tiempo de coagulación se puede medir sucesivamente o simultáneamente.

Basándose en el primer y segundo tiempo de coagulación que se miden como se ha descrito anteriormente, se determina si el LA está contenido en el espécimen. Específicamente, es preferible que el proceso de la determinación de la presencia o ausencia de LA en el espécimen se lleve a cabo utilizando los valores que se obtienen basándose en el primer y segundo tiempo de coagulación.

20 Ejemplos de los valores que se obtienen basándose en el primer y segundo tiempo de coagulación incluyen la diferencia o la relación entre el primer y el segundo tiempo de coagulación. Ejemplos de la diferencia incluyen un valor que se calcula a partir de la ecuación: “(el segundo tiempo de coagulación)-(el primer tiempo de coagulación)” y un valor calculado a partir de la ecuación “(el primer tiempo de coagulación)-(el segundo tiempo de coagulación)”.

25 Ejemplos de la relación incluyen un valor que se calcula a partir de la ecuación: “(el segundo tiempo de coagulación)/(el primer tiempo de coagulación)” y un valor que se calcula a partir de la ecuación: “(el primer tiempo de coagulación)/(el segundo tiempo de coagulación)”.

30 En el kit de reactivos de la presente invención, la prolongación del primer tiempo de coagulación por LA se suprime por la sal de manganeso del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación. Por lo tanto, se prevé que el primer tiempo de coagulación sea igual o más corto que el segundo tiempo de coagulación.

35 En consecuencia, en el caso en el que, por ejemplo, se utilice el valor que se calcula de la ecuación: “(el segundo tiempo de coagulación)-(el primer tiempo de coagulación)” como la diferencia del primer y segundo tiempo de coagulación en el proceso de determinación, puede determinarse que el LA está presente en el espécimen que se obtiene del sujeto cuando el valor es grande. Por el contrario, cuando el valor que se calcula de la ecuación: “(el segundo tiempo de coagulación)-(el primer tiempo de coagulación)” es pequeño (0 o incluye un valor negativo), se puede determinar que el LA no está presente en el espécimen.

40 En el caso en el que la presencia o ausencia de LA en el espécimen se determina utilizando, por ejemplo, el valor calculado por la ecuación: “(el segundo tiempo de coagulación)/(el primer tiempo de coagulación)” como la relación del primer tiempo de coagulación y el segundo tiempo de coagulación, se puede evaluar que el LA está presente en el espécimen cuando la relación es grande. Por el contrario cuando el valor que se calcula a partir de la ecuación: “(el segundo tiempo de coagulación)/(el primer tiempo de coagulación)” es pequeño, puede determinarse que el LA no está presente en el espécimen.

50 El proceso de determinación de la presencia o ausencia de LA en el espécimen se puede llevar a cabo de manera experimental acumulando los datos del primer y segundo tiempo de coagulación del espécimen de un sujeto sano y el espécimen de un sujeto con LA. Desde el punto de vista de la determinación más precisa, es preferible que el proceso de determinación de la presencia o ausencia de LA en el espécimen se lleve a cabo basándose en los resultados obtenidos por la comparación de un valor que se obtiene basándose en el primer y segundo tiempo de coagulación que se obtiene del espécimen del sujeto con respecto a un umbral de valores como se describe posteriormente.

55 Es preferible que el umbral de valores se determine basándose en una relación del tiempo de coagulación del espécimen que se obtiene del sujeto con respecto al tiempo de coagulación del plasma sanguíneo normal, por ejemplo, por el Índice de Rosner (E. Rosner et al., *Thromb. Haemast.* 1987, 57:144-147) o Relación Lupus (a la que también se hace referencia como valor LR) (R. Schjetlein et al., *Thromb. Res.* 1993, 69:239-250).

60 La expresión “Relación Lupus (valor LR)” en el presente documento significa un valor calculado por la Ecuación (I) posterior.

$$\text{Ecuación (I): Relación Lupus} = (b/a)/(d/c) = bc/ad$$

65 (en donde, a, b, c, y d respectivamente, representan los valores que se miden de la siguiente manera: a: tiempo de coagulación que se obtiene a partir del espécimen del sujeto y el primer reactivo de medición del tiempo de

coagulación; b: tiempo de coagulación que se obtiene del espécimen del sujeto y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación; c: tiempo de coagulación que se obtiene de un espécimen de un sujeto sano (plasma sanguíneo normal) y el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación; y d: tiempo de coagulación que se obtiene del espécimen de un sujeto sano (plasma sanguíneo normal) y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación).

En el caso del plasma sanguíneo normal, el valor de LR es alrededor de 1. Al igual, el valor de LR de cada uno de los especímenes de los pacientes con deficiencia de factores de coagulación, pacientes a los que se les administra warfarina, o pacientes a los que se les administra heparina es alrededor de 1 debido a que no se reconoce la diferencia entre el primero y segundo tiempo de coagulación a pesar del hecho de que el tiempo de coagulación es mayor en comparación con el caso de plasma sanguíneo normal. Por otro lado, en el caso de los especímenes que se obtienen de pacientes positivos a LA, el segundo tiempo de coagulación es más largo que el primer tiempo de coagulación debido a la presencia de LA en el espécimen, y por lo tanto el valor LR de los pacientes con LA es mayor de 1. En consecuencia, los especímenes que contienen LA, es decir, los especímenes que se derivan de pacientes positivos a LA se pueden detectar automáticamente comparándolos con el valor LR del plasma sanguíneo normal.

Es preferible que el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que se va a utilizar para el método de la presente invención contenga fosfolípidos y el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contenga fosfolípidos a una concentración menor que la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación. El fosfolípido es al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, y fosfatidilserina.

El primer y segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que se van a utilizar para el método de la presente invención puede contener otros componentes tales como un activador, veneno de serpiente, un factor tisular, y una sal de calcio. Ejemplos del activador incluyen ácido elálgico, caolín, cerita, y sílice.

Ejemplos

De aquí en adelante, se explicarán los Ejemplos, sin embargo, la presente invención no se limita a éstos.

Ejemplo 1 Examen del efecto de una sal de manganeso y otras sales metálicas divalentes en la extensión del tipo de coagulación por el LA

Se examinaron las influencias sobre la relación del tiempo de coagulación durante la medición de un espécimen positivo a LA en el caso de añadir varias sales metálicas a los reactivos para medir el LA

1. Preparación de reactivos

Se prepararon los reactivos de medición del tiempo de coagulación que se basan en el principio de un tiempo de tromboplastina parcial activada. En cuanto a los reactivos, se hizo referencia a un reactivo que contenía cada sal metálica como un reactivo LA-M (+) y se hacía referencia a un reactivo que no contenía sal metálica como un reactivo LA-M (-). El reactivo LA-M (+) está compuesto por el primer reactivo parcial y el segundo reactivo parcial y el reactivo LA-M (-) está compuesto por el tercer reactivo parcial y el cuarto reactivo parcial.

El primer reactivo parcial se preparó mezclando 50 mM de HEPES (peso molecular: 238,30, Kishida Chemical Co., Ltd.), 0,1 mM de ácido elálgico (peso molecular 338,22 Kishida Chemical Co., Ltd.), 25 mM de Tris (peso molecular 121,14, Kishida Chemical Co., Ltd.), 15 µg/ml de PE (peso molecular: 744,04, Nacalai Tesque, Inc.), 30 µg/ml de PC (peso molecular 786,15, Nacalai Tesque, Inc.), y 5 µg/ml de PS (peso molecular 810,30, Nacalai Tesque, Inc.), con cloruro de magnesio hexahidrato (peso molecular 203,30, Kishida Chemical Co., Ltd.), cloruro de manganeso tetrahidrato (peso molecular: 197,92, Hirose Chemical Co., Ltd.), cloruro de cobalto hexahidrato (peso molecular 237,93, Nacalai Tesque, Inc.), sulfato de cobre pentahidrato (peso molecular 249,69, Kishida Chemical Co., Ltd.), o cloruro de zinc (peso molecular: 136,3, Kishida Chemical Co., Ltd.) a una concentración final de 0,5 mM. El primer reactivo parcial incluye el ácido elálgico que contiene la sal metálica y el quelato que se forman. El pH del primer reactivo parcial se ajustó a 7,35.

La composición del tercer reactivo parcial es el mismo que el primer reactivo parcial excepto que la sal metálica no está incluida. El pH del tercer reactivo parcial se ajustó a 7,35.

El segundo y cuarto reactivo parcial eran una solución que se preparó disolviendo cloruro cálcico (peso molecular: 111,0, Kishida Chemical Co., Ltd.) en agua purificada a una concentración de 25 mM.

2. Medición de las muestras

Los especímenes positivos a LA que se utilizaron en la presente eran Gradiplasma LA Low (Gradipore Ltd.), Gradiplasma LA High (Gradipore Ltd.), y George King LA (George King Bio-Medical, Inc.).

Se utilizó el Coagtrol N (SYSMEX CORPORATION) que es una muestra normal como espécimen de control negativo.

3. Medición de los tiempos de coagulación

5 Se prepararon dos grupos de 50 µl de tres tipos de especímenes positivos a LA. Los especímenes de uno de los grupos se mezcló con 50 µl del primer reactivo parcial. Los especímenes del otro grupo se mezclaron con 50 µ del tercer reactivo parcial. Las mezclas resultantes se calentaron a 37 °C durante 3 minutos. A continuación, las mezclas se mezclaron con 50 µl del segundo reactivo parcial (o el cuarto reactivo parcial) y se midió el tiempo de
10 coagulación. El tiempo de coagulación se midió con un analizador de coagulación automático "Coagrex-800" (Shimadzu Corp.).

4. Cálculo de la relación de tiempos de coagulación

15 La relación de tiempos de coagulación se calculó a partir de los tiempos de coagulación que se obtuvieron midiendo el tiempo de coagulación de cada espécimen de acuerdo con la Ecuación (A) posterior.

$$\text{Ecuación (A): (relación de tiempos de coagulación) = (b/a)/(d/c) = bc/ad}$$

20 (en donde, a, b, c, y d respectivamente, representan valores medidos de la siguiente manera: a: tiempo de coagulación que se obtiene del espécimen positivo a LA y el reactivo LA-M (+); b: tiempo de coagulación que se obtiene del espécimen positivo a LA y el reactivo LA-M (-); c: tiempo de coagulación que se obtiene de la muestra normal y el reactivo LA-M (+); y d: tiempo de coagulación que se obtiene del espécimen de la muestra normal y el reactivo LA-M (-)).

25 En cuanto a la relación de tiempos de coagulación que se obtuvieron de los especímenes de LA, se calculó el valor medio de los tres especímenes. Los resultados se muestran en la Fig. 1. En la Fig. 1 Mg es cloruro de magnesio hexahidrato, Mn es cloruro de manganeso tetrahidrato, Co es cloruro de cobalto hexahidrato, Cu es sulfato de cobre pentahidrato, y Zn es cloruro de zinc. La expresión "sin adición" significa una relación del tiempo de coagulación por
30 el reactivo LA-M (-).

Como es evidente en la Fig. 1, la relación de los tiempos de coagulación en los reactivos a los que se añaden sales metálicas distintas de cloruro de manganeso tetrahidrato era desde aproximadamente 1,0 a 1,1.

35 Por otro lado, en el caso del reactivo al que se añade el cloruro de manganeso tetrahidrato, la relación del tiempo de coagulación estaba aumentada hasta aproximadamente 1,4. Por lo tanto, el cloruro de manganeso tetrahidrato era eficaz en la supresión de la extensión del tiempo de coagulación en el espécimen positivo a LA. Esto sugiere que el espécimen positivo a LA podría detectarse específicamente por un sistema de medición que utiliza el reactivo para
40 detectar LA que contiene una sal de manganeso.

Ejemplo 2 Separación del espécimen positivo a LA del espécimen negativo a LA utilizando un reactivo para detectar LA que contiene una sal de manganeso

45 Se examinó si un espécimen positivo a LA podía separarse claramente del espécimen negativo a LA utilizando el reactivo para detectar LA que contiene una sal de manganeso.

Se prepararon los reactivos para detectar LA (sistemas de dos reactivos) que se basaban en el principio del tiempo de tromboplastina parcial activada. En los reactivos, se hace referencia a un reactivo que contiene una sal de manganeso y fosfolípidos como un reactivo LA-H y se hace referencia al reactivo que contiene fosfolípido a una
50 concentración menor que la del reactivo LA-H como un reactivo LA-L. El reactivo LA-H está compuesto por el primer reactivo parcial y el segundo reactivo parcial y el reactivo LA-L está compuesto por el tercer reactivo parcial y el cuarto reactivo parcial.

55 El primer reactivo parcial se preparó mezclando 50 mM de HEPES (Kishida Chemical Co., Ltd.), 0,1 mM de ácido elágico (Kishida Chemical Co., Ltd.), 25 mM de Tris (Kishida Chemical Co., Ltd.), 60 µg/ml de PE (Nacalai Tesque, Inc.), 120 µg/ml de PC (Nacalai Tesque, Inc.), y 20 µg/ml de PS (Nacalai Tesque, Inc.), con cloruro de manganeso tetrahidrato (Hirose Chemicals Co., Ltd.) a una concentración final de 0,5 o 1,0 mM. Este primer reactivo parcial también incluye ácido elágico y contiene la sal metálica o el quelato que se forman.

60 Como control del primer reactivo parcial, se preparó también un reactivo sin contenido en cloruro de manganeso tetrahidrato. El pH de estos reactivos se ajustó a 7,35.

65 El tercer reactivo parcial contenía 50 mM de HEPES (Kishida Chemical Co., Ltd.), 0,1 mM de ácido elágico (Kishida Chemical Co., Ltd.), 25 mM de Tris (Kishida Chemical Co., Ltd.), 15 µg/ml de PE (Nacalai Tesque, Inc.), 30 µg/ml de PC (Nacalai Tesque, Inc.), y 5 µg/ml de PS (Nacalai Tesque, Inc.). El tercer reactivo parcial también incluye ácido elágico que contiene la sal metálica y el quelato que se forman. El pH del tercer reactivo parcial se ajustó a 7,35.

El segundo y el cuarto reactivo parcial eran una solución que se preparó por disolución de cloruro cálcico (peso molecular: 111,0, Kishida Chemical Co., Ltd.) en agua purificada con una concentración final de 25 mM.

2. Medición de muestras

5 Los especímenes negativos a LA que se utilizaron eran de una muestra normal, Coagtrol N (SYSMEX CORPORATION), plasma sanguíneo de 4 donantes sanos (SUNFCO LTD.), plasma sanguíneo heparinizado de 2 pacientes (plasma sanguíneo que se prepara añadiendo heparina no fraccionada (Mochida Pharmaceuticals Co., Ltd.) a Coagtrol N con una concentración final de 0,25 o 0,5 U/ml), plasma sanguíneo de 4 pacientes que tenían un defecto de factores de coagulación (George King Bio-Medical, Inc), y plasma sanguíneo de 3 pacientes a los que se administraba warfarina (George King Bio-Medical, Inc).

10 Los especímenes positivos a LA que se utilizaron eran de plasma sanguíneo de 24 pacientes positivos a LA (SUNFCO LTD.).

15 3. Medición de los tiempos de coagulación

20 Se prepararon dos grupos de 50 µl. Los especímenes de uno de los grupos se mezclaron con 50 µl del primer reactivo parcial. Los especímenes del otro grupo se mezclaron con 50 µl del tercer reactivo parcial. Las mezclas resultantes se calentaron a 37 °C durante 3 minutos. A continuación, estas mezclas se mezclaron con 50 µl del segundo reactivo parcial (o el cuarto reactivo parcial) y se midió el tiempo de coagulación. El tiempo de coagulación se midió con un analizador de coagulación automático "Coagrex-800" (Shimadzu Corp.).

25 4. Cálculo de la Relación Lupus

La Relación Lupus se calculó a partir de los tiempos de coagulación que se obtuvieron midiendo el tiempo de coagulación de cada espécimen de acuerdo con la Ecuación (B) a continuación.

30 **Ecuación (B): (Relación Lupus) = (b/a)/(d/c) = bc/ad**

35 (en donde, a, b, c, y d respectivamente, representan valores medidos de la siguiente manera: a: el tiempo de coagulación que se obtiene del espécimen positivo a LA y los reactivos LA-H; b: el tiempo de coagulación que se obtiene a partir del espécimen positivo a LA y el reactivo LA-L; c: el tiempo de coagulación que se obtiene a partir de la muestra normal y los reactivos LA-H; y d: el tiempo de coagulación que se obtiene a partir de la muestra normal y el reactivo LA-L).

40 La distribución de la Relación Lupus con respecto a cada uno de los reactivos para detectar LA que se ha calculado a partir del espécimen negativo a LA y el espécimen positivo a LA se muestra en la Fig. 2. La Fig. 2 muestra que la Relación Lupus del espécimen positivo a LA está aumentado en el sistema de medición que utiliza el reactivo que contiene una sal de manganeso. Por lo tanto, se ha confirmado que el kit de reactivos para detectar LA de la presente invención puede separar más claramente el espécimen positivo a LA del espécimen negativo a LA en comparación con los kits de reactivos que no contienen una sal de manganeso.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de reactivos para detectar un anticoagulante lúpico que comprende:
 - 5 un primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de manganeso, fosfolípidos y un activador para producir la coagulación *in vitro* que se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido elágico, caolín, cerita y sílice;
 - 10 un segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de manganeso, fosfolípidos y un activador para producir la coagulación *in vitro* que se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido elágico, caolín, cerita y sílice, en donde la relación de la concentración de la sal de manganeso en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación con respecto a la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación es de 0 a 0,2; y
 - 15 un tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de calcio.
2. El kit de reactivos para detectar anticoagulante lúpico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípidos a una concentración menor que la concentración de fosfolípidos en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación.
3. El kit de reactivos para detectar anticoagulante lúpico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el fosfolípido es al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, y fosfatidilserina.
4. Un método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico que comprende las etapas de:
 - 25 proporcionar un primer espécimen y un segundo espécimen, que se obtienen ambos del mismo sujeto;
 - mezclar el primer espécimen con un primer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de manganeso, fosfolípidos y un activador para producir coagulación *in vitro* que se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido elágico, caolín, cerita y sílice, y un tercer reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de calcio para medir un primer tiempo de coagulación;
 - 30 mezclar el segundo espécimen con un segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de manganeso, fosfolípidos y un activador para producir una coagulación *in vitro* que se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido elágico, caolín, cerita, y sílice, y un cuarto reactivo de medición del tiempo de coagulación que contiene una sal de calcio para medir un segundo tiempo de coagulación, en donde la relación de la concentración de la sal de manganeso en el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación con respecto a la del primer reactivo de medición del tiempo de coagulación es desde 0 a 0,2; y
 - 35 determinar si el anticoagulante lúpico está contenido en el espécimen basándose en el primer y segundo tiempo de coagulación que se han medido.
5. El método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de acuerdo con la reivindicación 4, en donde se determina si el anticoagulante lúpico está contenido en el espécimen comparando un valor que se obtiene basándose en el primer y segundo tiempo de coagulación con respecto al valor de un umbral predeterminado.
6. El método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en donde el segundo reactivo de medición del tiempo de coagulación contiene fosfolípidos a una concentración menor que la concentración de fosfolípidos en el primer reactivo de medición del tiempo de coagulación.
7. El método para determinar la presencia o ausencia de anticoagulante lúpico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el fosfolípido es al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, y fosfatidilserina.

50

FIG. 1

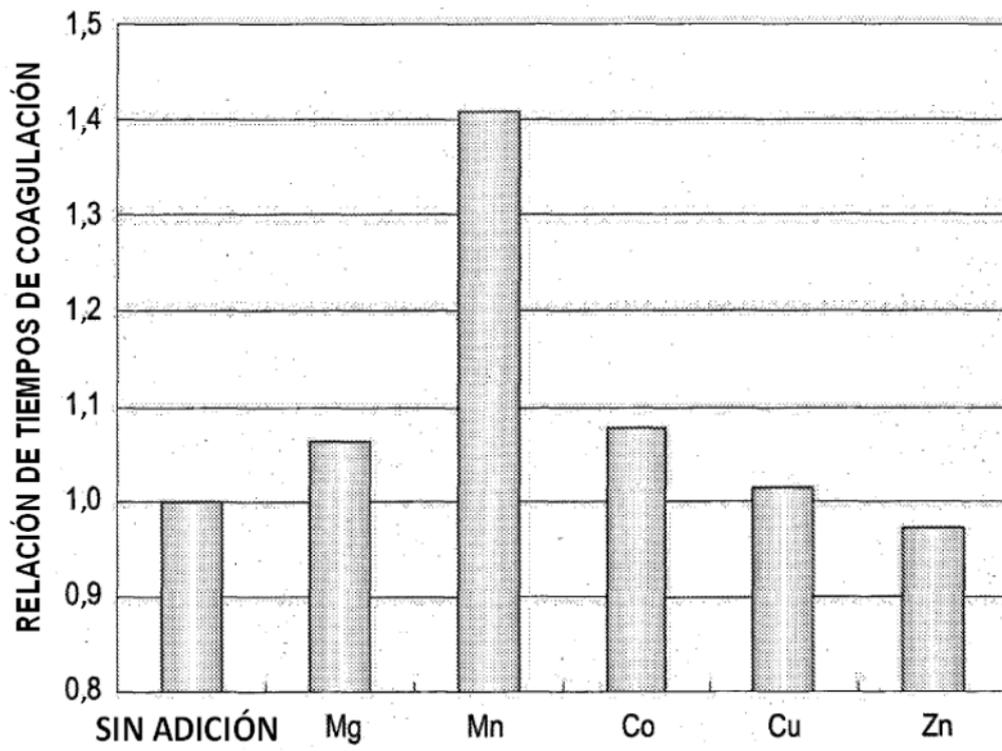


FIG. 2

