

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 303**

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: **12.12.2011** **E 11192935 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016** **EP 2471946**

54 Título: **Método para determinar inhibidores de coagulación**

30 Prioridad:

30.12.2010 EP 10197337

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

16.06.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KAPPEL, ANDREAS;
WISSEL, THOMAS;
RECHNER, ANDREAS y
STEPHAN, SINA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 574 303 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para determinar inhibidores de coagulación

La presente invención se encuentra en el campo de los diagnósticos de coagulación y se refiere a un método homogéneo para determinar inhibidores de factores de coagulación proteolíticamente activos (anticoagulantes) en una muestra, principalmente inhibidores directos de trombina y factor Xa, como también a un kit de ensayo para usarse en un método de este tipo.

Las terapias anticoagulantes comunes apuntan en primer lugar a la inhibición de los factores de coagulación procoagulatorios trombina (factor IIa, FIIa) y factor Xa (FXa). Se distingue entre anticoagulación oral con antagonistas de vitamina K, como Coumadin por ejemplo, por lo cual se efectúa una inhibición de la síntesis de factor de coagulación, y la anticoagulación mediante inhibición de los factores activos de coagulación en la corriente sanguínea. Entre los anticoagulantes que inhiben o activan los factores activos de coagulación en la corriente sanguínea se distinguen anticoagulantes con acción directa y anticoagulantes con acción indirecta. Los anticoagulantes con acción directa, tales como por ejemplo rivaroxaban, dabigatran o melagatran, se enlazan a la trombina o al factor Xa y por lo tanto son altamente específicos. Anticoagulantes con acción indirecta como por ejemplo heparina se enlazan a inhibidores de factor de coagulación endógenos tales como antitrombina, por ejemplo, e intensifican en muchas veces su acción anticoagulante.

Todos los anticoagulantes que inhiben los factores activos de coagulación en la corriente sanguínea se distinguen por un patrón específico de desactivación. Determinadas clases de sustancias como, por ejemplo, heparina no fraccionada, de alto peso molecular, inhiben tanto la trombina como el factor Xa. Otras sustancias actúan de manera altamente específica, inhibiendo de esta manera trombina (por ejemplo, hirudin, dabigatran, melagatran) o factor Xa (por ejemplo, pentasacáridos como fondaparinux, rivaroxaban).

Inhibidores directos e indirectos de los factores de coagulación procoagulatorios del sistema de coagulación sanguínea, el factor Xa y trombina desempeñan un papel creciente en el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares y tromboembólicas. Estos inhibidores pueden detectarse mediante ensayos establecidos actualmente sólo de una manera muy compleja. Un ensayo simple y sensible para dicha sustancia sería importante tanto para monitorear la terapia como para detectar la presencia de dichas sustancias en una muestra de paciente anónima. Estos ensayos tendrían que poder detectar una cantidad relativamente alta de inhibidores estructuralmente no relacionados de trombina o de F Xa de una manera altamente sensible.

En los ensayos cromogénicos aplicados en la actualidad para determinar anticoagulantes en la muestra de paciente que va a investigarse, que habitualmente se compone de plasma, se mezcla con un sustrato para un factor de coagulación. Puesto que la mayoría de los factores de coagulación sanguínea son endopeptidasas de serina, es decir hidrolasas que pueden disociar enlaces de péptido, principalmente se utilizan sustratos de péptido que se disocian tan específicamente como es posible por el factor de coagulación sanguínea que va a determinarse y que tienen un grupo de señal detectable. En los ensayos cromogénicos establecidos, incluso en los disponibles comercialmente, se utilizan principalmente los cromóforos para-nitroanilina (pNA) y ácido 5-amino-2-nitro-benzoico (ANBA), los cuales tienen un máximo de absorción a 405 nm. El color amarillo producido se determina normalmente por medio de fotometría. Al determinar anticoagulantes, la concentración de color en la mezcla de ensayo es inversamente proporcional a la concentración de anticoagulante en la muestra.

En un primer grupo de ensayos cromogénicos aplicados en la actualidad para determinar anticoagulantes que inhiben la actividad de factores de coagulación sanguínea, la muestra de paciente que va a ensayarse se mezcla usualmente con una cantidad definida de un factor de coagulación activado y con un sustrato para este factor de coagulación. Cuanto más anticoagulante esté presente en la muestra, más intensamente se inhibe el factor de coagulación activado y menos sustrato se disocia. Ejemplos de ensayos comercialmente disponibles a base de este principio de ensayo son el ensayo de heparina Berichrom® de Siemens Healthcare Diagnostics para determinar heparina por medio de la inhibición de factor Xa adicionado o el ensayo de actividad de hirudina de Siemens Healthcare Diagnostics para determinar hirudina por medio de la inhibición de trombina adicionada.

En un segundo grupo de ensayos cromogénicos actualmente aplicados para determinar anticoagulante, la muestra de paciente que va a ensayarse se mezcla con un factor de coagulación inactivo, un activador de coagulación y con un sustrato cromogénico para el factor de coagulación. Adicionando el activador de coagulación primero se activa el factor de coagulación inactivo adicionado. Cuanto más anticoagulante esté contenido en la muestra, más intensamente se inhibe el factor de coagulación activado y menos sustrato se disocia. Los ensayos comercialmente disponibles que se basan en este principio de ensayo son, por ejemplo, el ensayo Haemosys®-ECA T Test de JenAffin para la determinación de inhibidores de trombina sintéticos, directos o el ensayo Haemosys®-ECA H Test de JenAffin para determinar hirudina por medio de la inhibición de trombina/meizotrombina, el cual se forma adicionando protrombina y ecarina como activadores de coagulación en la muestra.

Otro principio de ensayo para determinar anticoagulantes se encuentra descrito en la EP-A1-2 177 625. En este principio de ensayo igualmente se determina la disociación de un sustrato específico al factor de coagulación,

aunque no con ayuda de sustratos cromogénicos sino con ayuda de un diferente sistema formador de señales. Este sistema comprende dos componentes que, al enlazarse simultáneamente al sustrato intacto, interactúan debido a la cercana proximidad espacial y generan una señal detectable, por ejemplo fluorescencia o quimioluminiscencia. Como consecuencia de la disociación de un enlace de péptido del sustrato, los dos componentes se separan uno de otro y, por lo tanto, no tiene lugar una señal. Cuanto más anticoagulante esté contenido en la muestra, más intensamente se inhibe el factor activador de coagulación, tanto menos sustrato se disocia y más intensamente es la formación de señal. La ventaja de los procedimientos de ensayo a base de fluorescencia o de quimioluminiscencia, frente a los ensayos cromogénicos, consiste fundamentalmente en que son más sensibles y permiten mediciones en sangre entera.

La desventaja del método antes descrito, en el cual un sustrato disociable se "sujeta" hasta cierta medida entre los dos componentes del sistema de señalización consiste en que el ligando del sustrato en ambos lados del sitio de disociación tiene que tener regiones para asociación con los componentes de señalización. Los ligandos de sustrato son habitualmente sustratos de péptido sintéticos, de bajo peso molecular, que tienen dos residuos artificiales para la asociación con los componentes que emiten señales, tales como, por ejemplo, una etiqueta bandera terminada en amino o un residuo de biotina terminado en carboxilo. Sin embargo, el acoplamiento de residuos de este tipo a sustratos de péptido con bajo peso molecular siempre está unido al riesgo de que la estructura del péptido se modifique de tal manera que ya no pueda enlazarse o disociarse por parte de la enzima que va a detectarse, por lo cual proporcionar ligandos de sustrato adecuados es técnicamente complejo.

Luego, es deseable modificar los métodos conocidos para determinación de anticoagulantes en los cuales se utilizan dos componentes que interactúan debido a la proximidad espacial y generan una señal detectable de tal manera que puedan utilizarse ligandos con bajo peso molecular que deban presentar de manera máxima un residuo artificial para la asociación con uno de los componentes generadores de señales.

Este objetivo se logra mezclando una alícuota de una muestra, de la cual se sospecha que contiene un anticoagulante, con una cantidad definida de un factor de coagulación activo de modo proteolítico y con un ligando que se enlaza al sitio activo del factor de coagulación proteolíticamente activo pero no se disocia por parte de éste en un enlace de péptido, e inhibiendo la señal generada por el sistema formador de señales como resultado del enlazamiento del ligando al factor de coagulación activado. El inhibidor del factor de coagulación activado que está contenido en la muestra, es decir el anticoagulante, compite de una manera dependiente de la concentración con el ligando por el enlazamiento al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo y de esta manera inhibe la generación de señal. Cuanto más anticoagulante esté contenido en la muestra tanto menor señal se genera.

La presente invención se refiere por lo tanto a un método para determinar un inhibidor de un factor de coagulación proteolíticamente activo, es decir un anticoagulante, en una muestra, y el cual comprende los pasos de

a) Proporcionar e incubar una mezcla de reacción que contiene

- i. Una alícuota de la muestra,
- ii. Una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo,
- iii. Al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo, pero no se disocia por parte de éste en un enlace de péptido,
- iv. Un primero y un segundo componente de un sistema formador de señal que interactúan de tal manera que surge una señal detectable cuando el primero y el segundo componente del sistema formador de señal se llevan a una proximidad espacial entre sí y en cuyo caso el factor de coagulación proteolíticamente activo se asocia con el primer componente del sistema formador de señal o se asociará durante la incubación y en cuyo caso el ligando está asociado con el segundo componente del sistema formador de señal o se asociará durante la incubación;

b) Medir la señal del sistema formador de señal, en cuyo caso la altura de la señal es inversamente proporcional a la concentración de anticoagulante en la muestra.

El término "anticoagulante" se utiliza con respecto a la presente invención para inhibidores de factores de coagulación proteolíticamente activos que son de origen natural o sintético y cuya utilización pretendida es la inhibición del sistema de coagulación in vivo en personas o animales. Esto incluye también sustancias de alto peso molecular como hirudina o heparina, que enlazan una enzima en diferentes sitios de enlazamiento aunque también compuestos de bajo peso molecular como rivaroxaban, dabigatran o melagatran, para los cuales es suficiente enlazarse solamente en el centro activo de la enzima con el fin de inhibir la reactividad. Los términos "anticoagulante" e "inhibidor de un factor de coagulación proteolíticamente activo" se utilizan como sinónimos en el contexto de la invención.

En relación con la presente invención, por el término "ligando" se entienden sustancias que se enlazan en el sitio activo de un factor de coagulación proteolíticamente activo y, por lo tanto, compiten con un inhibidor por el sitio de enlazamiento. Sin embargo, no se disocian ligandos adecuados en un enlace de péptido por parte del factor de coagulación proteolíticamente activo debido a que les falta un enlace de péptido dissociable por parte de dicho factor de coagulación proteolíticamente activo, es decir que no tienen un enlace de peptidilo (R-CONH-R, R = residuo de aminoácido) capaz de hidrolizarse por el factor de coagulación proteolíticamente activo. Ambos ligandos de enlazamiento reversible e irreversible son adecuados.

5

El ligando puede ser una molécula producida sintéticamente, de modo recombinante o biotecnológico, o puede ser una molécula de existencia natural.

10 Un ligando puede ser un derivado de péptido cuya secuencia se deriva de la secuencia de un sustrato natural de la enzima. Un ligando derivado de péptido para los propósitos de la presente invención difiere de un sustrato de péptido en que no se disocia hidrolíticamente por parte del factor de coagulación proteolíticamente activo, mientras que la disociación de un sustrato de péptido produce fragmentos que se liberan desde el sitio activo de la enzima y la enzima, sin modificaciones, proviene de la reacción.

15 Derivados de péptido adecuados comprenden de modo preferido 3 a aproximadamente 150 residuos de aminoácidos. Para no poder disociarse por el factor de coagulación proteolíticamente activo en un enlace de péptido, el grupo carboxilo carboxi-terminal de un derivado de péptido según la invención se reemplaza preferiblemente por un grupo funcional del grupo de aldehído (-CHO), cetona (-COR; R= alquilo o arilo), trifluorometilcetona (-COCF₃), ácido α-cetocarboxílico (-COCOOH), α-cetoamida (-COCONHR; R= alquilo o arilo) y α-cetoéster (-COCOOR; R= alquilo o arilo), éster (-COOR; R= alquilo o arilo), ácido borónico (-B(OR)₂), clorometilcetonas (-COCH₂Cl) y sulfonilfluoruros (-SO₂F). El derivado de péptido puede tener otras modificaciones estructurales, por ejemplo la utilización parcial de D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos de existencia natural.

20

La tabla 1 tiene ejemplos de grupos funcionales típicos para ligandos de derivado de péptido de enlazamiento reversible e irreversible.

25

Tabla 1

Tipo de ligando	Grupo funcional	
irreversible	Clorometilcetona	-COCH ₂ Cl
	Fluoruro de sulfonilo	-SO ₂ F
	Éster	-COOR (R=Alquilo o Arilo)
	Ácido borónico	B(OR ₂) (R=Alquilo o Arilo)
	Aldehído	-CHO
reversible	Cetona	-COR (R=Alquilo o Arilo)
	Trifluorometilcetona	-COCF ₃
	Ácido α-cetocarboxílico	-COCOOH
	α-Cetoamida	-COCONHR (R=Alquilo o Arilo)
	α-Cetoéster	-COCOOR (R=Alquilo o Arilo)

Ejemplos de ligandos de derivado de péptido que se enlazan en el centro activo de trombina pero que no se disocian por ésta en un enlace de péptido, son:

- H-D-Fe-Pro-Arg-H
- Me-D-Fe-Pro-Arg-H
- H-D-Fe-Pro-Agm
- H-D-Fe-Pro-Arg-CH₂-Cl
- H-D-Fe-Pro-Arg-CH₂F
- Boc-DL-Dpa-Pro-Arg-H

30

- Ac-D-Fe-Pro-boroArg pinanodiol éster
- D-Fe-Pro-NH-CH(metoxipropil)-P(O)(OPh)₂

Ejemplos de ligandos derivados de péptido que se enlazan en el centro activo del factor Xa pero no se disocian por éste en un enlace de péptido son:

- 5
- D-Arg-Gly-Arg-H
 - Dansilo-Glu-Gly-Arg-CH₂Cl

Respecto de los ligandos derivados de péptido mencionados, véase también Claeson, G., Blood Coagulation and Fibrinolysis 5, 1994, 411-436.

- 10
- Un ligando puede ser además un compuesto que no pertenece al grupo de los compuestos de péptido tales como, por ejemplo, un éster de arginina, un éster de amidinofenilalanina, un éster de p-guanidinofenilalanina, un éster de 3-amidinofenilalanina, un derivado dibásico de ácido (amidinoaril)propanoico o un derivado de oxazolidinona.

Ligandos derivados de arginina que se enlazan en el sitio activo de trombina pero no se disocian por ésta en un enlace de péptido son, por ejemplo, N α -arilsulfonilargininamida (R₁-SO₂-Arg-N-R₂/R₃; R₁= grupo hidrofóbico alifático o aromático) (Claeson, G., Blood Coagulation and Fibrinolysis 5, 1994, 411-436).

- 15
- Ligandos derivados de amidinofenilalanina que se enlazan en el centro activo de trombina pero no son disociados por ésta en un enlace de péptido son, por ejemplo, N α -(β -naftilsulfonil)-4-amidinofenilalanina piperidida o N α -(β -naftilsulfonil-glucil)-4-amidinofenilalanina piperidida (Claeson, G., Blood Coagulation and Fibrinolysis 5, 1994, 411-436).

- 20
- Un ligando derivado de p-guanidinofenilalanina, que se enlaza en el centro activo de trombina, pero no se disocia por parte de ésta en un enlace de péptido es, por ejemplo, Tos-Gpa-piperidida (Claeson, G., Blood Coagulation and Fibrinolysis 5, 1994, 411-436).

Un ligando derivado de éster de 3-amidinofenilalanina, el cual se enlaza en el centro activo del factor Xa, pero no se disocia por parte de éste es, por ejemplo, N α -(β -naftilsulfonil-glicil)-3-amidinofenilalanina (Claeson, G., Blood Coagulation and Fibrinolysis 5, 1994, 411-436).

- 25
- Un ligando derivado de ácido (amidinoaril)propanoico dibásico, que se enlaza en el centro activo del factor Xa, pero no se disocia por parte de éste en un enlace de péptido, es, por ejemplo, ácido (2S)-2-[4[[[(3S)-1-acetimidol-3-pirrolidinil]oxil]fenil]-3-(7-amidino-2-naphtil)propanoico (Nagahara, T. et al., J. Med. Chem. 1994, 37, 1200-1207).

- 30
- Un ligando derivado de oxazolidinona que se enlaza en el centro activo del factor Xa, pero no se disocia por parte de éste en un enlace de péptido, es por ejemplo 5-cloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorfolin-4-il)fenil]-1,3-oxazolidin-5-il)metil)tiofen-2-carboxamida (Roehrig, S., et al., J. Med. Chem. 2005, 48(19), 5900-5908).

Por ligando de enlazamiento reversible se entiende un ligando que dependiendo de la concentración de al menos un inhibidor natural o sintético puede desplazarse del centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo.

- 35
- Ejemplos de ligandos adecuados que se enlazan a trombina de modo reversible son derivados de péptido tales como, por ejemplo, H-D-Fe-Pro-Arg-H, Me-D-Fe-Pro-Arg-H o H-D-Fe-Pro-Agm. En agmantina (Agm) el grupo carboxilo está reemplazado por hidrógeno. Otros ligandos que se enlazan a la trombina de modo reversible son N α -arilsulfonilargininamida (R₁-SO₂-Arg-N-R₂/R₃) o derivados de amidinopiperidina tales como N α -(β -naftilsulfonil)-4-amidinofenilalanina piperidida o derivados de p-guanidinofenilalanina (Gpa), amidinofenilalanina (Apa) como, por ejemplo, Tos-Gpa-piperidida y Tos-Apa-piperidida o también ácidos péptido amino borónicos como por ejemplo Ac-D-Fe-Pro-NH-CH(CH₂-fenil)-B-OPin y D-Ala-Pro-NH-CH(metoxipropil)-P(O)(OPh)₂.

- 40
- Ejemplos de ligandos adecuados que se enlazan de modo reversible al factor Xa son derivados de péptido tales como, por ejemplo, D-Arg-Gli-Arg-H o derivados de benzamidina y ésteres de 3-amidinofenilalanina como por ejemplo N α -(β -naftilsulfonil-glicil)-3-amidinofenilalanina.

- 45
- Por ligando que se enlaza de manera irreversible se entiende un ligando el cual se enlaza en el centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo independientemente de la concentración y el cual ya no puede desplazarse porque forma un enlace covalente con la enzima, por ejemplo y modifica la enzima de tal manera que el sitio activo se desactiva de modo reversible. Ligandos típicos que se enlazan de manera irreversible se componen de una parte que los introduce en el centro activo de la enzima y de un grupo químicamente reactivo que es capaz de formar enlaces covalentes con la enzima, es decir con la función hidroxilo de la serina en el centro activo en el caso de los factores de coagulación proteolíticamente activos. Para formar el enlace covalente con la enzima, una

parte del grupo funcional se retira del ligando el cual, en la misma etapa de reacción, se enlaza de modo covalente con la enzima.

Ejemplos de ligandos adecuados que se enlazan de modo irreversible a trombina son H-D-Fe-Pro-Arg-CH₂-Cl o H-DFe-Pro-Arg-CH₂F.

5 Un ejemplo de un ligando adecuado que se enlaza de modo reversible al factor Xa es dansilo-Glu-Gli-Arg-CH₂Cl.

Pueden distinguirse ligandos que se enlazan de modo reversible e irreversible por su cinética de reacción. Al graficar 1/v, donde v es la velocidad de reacción, frente a la concentración de ligando (i) a concentración constante de sustrato (S) se obtiene una recta. Al utilizar dos o más concentraciones diferentes de sustrato (S₁, S₂... S_N) las líneas se intersecan en un punto. El valor del eje de abscisa de éste punto corresponde a -K_i, donde K_i corresponde a la constante de enlazamiento; véase la figura 3 fragmento (Dixon, M., 1953, Biochem J, 55, 170-171). En caso de una inhibición irreversible las curvas se encuentran en un solo punto sobre el eje x que nuevamente corresponde a -K_i.

Ligandos preferidos tienen una afinidad de enlazamiento hacia el factor de coagulación proteolíticamente activo la cual corresponde a la afinidad del anticoagulante que va a determinarse o es más baja. Inhibidores de trombina utilizados como anticoagulantes presentan una constante de enlazamiento para trombina en el intervalo de 2,7 x 10⁻¹⁴ Mol (hirudina) a 1,9 x 10⁻⁸ Mol (argatroban) (Prasa, D. et al., Thromb Haemost 77, 1997, 498-503). Los inhibidores de trombina también se enlazan, aparte de la trombina, al F Xa, aunque también con afinidad esencialmente más baja, es decir con una constante de enlazamiento más grande de 2,1 x 10⁻⁴ Mol, como por ejemplo argatroban (Prasa, D. et al., Thromb Haemost 78, 1997, 1215-1220). Los inhibidores de F Xa tiene una constante de enlazamiento en el intervalo de 8 x 10⁻¹¹ Mol (apixaban) hasta 6,6 x 10⁻⁹ Mol (LY517717 difumarato), en cuyo caso los inhibidores de F Xa también se enlazan a trombina en cierta medida, aunque 10.000 veces más débilmente, por ejemplo rivaroxaban (Perzborn, E., Hämostaseologie 3, 2009, 260-267). Ligandos reversibles pueden desplazarse de esta manera por el inhibidor que va a determinarse del centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo. De esta manera, los ligandos irreversibles con una afinidad seleccionada de modo correspondiente no pueden desplazar el medicamento a determinarse del centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo en un lapso de tiempo relevante. Por otra parte, la afinidad no tiene que ser demasiado baja porque de otra manera no puede producirse una señal.

La constante de enlazamiento de ligandos adecuados se encuentra, por lo tanto, de manera preferente en un intervalo de 0,0001 a 100.000 nM (10⁻¹³ a 10⁻⁴ M), particularmente preferible en un intervalo de 0,1 a 10.000 nM (10⁻¹⁰ a 10⁻⁵ M), muy particularmente preferible en un intervalo de 1 a 1000 nM (10⁻⁹ a 10⁻⁶ M) .

30 En el contexto de la presente invención, por el término "muestra" ha de entenderse el material del cual se sospecha que contiene el anticoagulante que va a detectarse. El término "muestra" comprende en particular fluidos o tejidos biológicos de humanos y animales tales como sangre, plasma, suero y también otros fluidos, secreciones o extractos corporales.

El método de la invención comprende proporcionar e incubar una mezcla de reacción que comprende una alícuota de la muestra, una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo, al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo pero no se disocia por éste en un enlace de péptido, un primer y un segundo componente de un sistema formador de señales los cuales interactúan de tal manera que surge una señal detectable cuando el primer y segundo componente del sistema formador de señal se llevan a proximidad espacial entre sí. El factor de coagulación proteolíticamente activo está asociado o se asociará durante la incubación con el primer componente del sistema formador de señal. El ligando está asociado o se asociará durante la incubación con el segundo componente del sistema formador de señal. A causa del enlazamiento del ligando al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo, los componentes del sistema formador de señal se llevan a proximidad espacial uno del otro, por lo cual surge una señal detectable que se correlaciona con la actividad del factor de coagulación proteolíticamente activo en la mezcla de reacción. El anticoagulante contenido en la muestra compite dependiendo de la concentración con el ligando no disociable en un enlace de péptido por el enlazamiento al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo y de esta manera inhibe la generación de señal. Cuanto más anticoagulante esté contenido en la muestra, menos señal se genera. Las señales formadas se miden y la altura de la señal es inversamente proporcional a la concentración de anticoagulante en la muestra.

50 El método de la invención es adecuado para determinar inhibidores de los factores de coagulación proteolíticamente activos trombina (factor IIa), factor VIIa, factor IXa, factor Xa, factor XIa o factor XIIa.

De la especificidad del anticoagulante que va a determinarse depende cuál factor de coagulación activado y cuál ligando se adicionan a la mezcla de reacción.

55 Para la determinación de una heparina, es decir una heparina no fraccionada de alto peso molecular (HMW Heparina) o una heparina de bajo peso molecular (LMW Heparin) o un heparinoide, en particular es adecuada la adición de trombina o de factor Xa y la adición de un ligando con especificidad de trombina o de factor Xa. Para la

determinación de un inhibidor directo de trombina, por ejemplo de argatroban, melagatran, ximelagatran, bivalirudina, dabigatran, hirudina, lepirudina, MCC-977, SSR-182289, TGN-255, TGN-167, ARC-183 y odiparcil, principalmente es adecuada la adición del factor IIa (trombina) y la adición de un ligando con especificidad de trombina. Para la determinación de un inhibidor directo de factor Xa, por ejemplo de rivaroxaban; apixaban; otamixaban, los cuales se compilan en la nueva clase de sustancias de los xabanos; fondaparinux; LY 517717; YM 153; DU-176b; DX-9065a y KFA-1982 principalmente es adecuada la adición de factor Xa y de un ligando específico de factor Xa.

El factor de coagulación proteolíticamente activo, añadido a la mezcla de reacción puede ser un factor de coagulación que haya sido aislado de tejidos o fluidos corporales animales o humanos, tales como, por ejemplo, sangre o plasma, o aislado de los sobrenadantes o lisados de cultivos celulares animales o humanos, o de cultivos de células eucariotas o de microorganismos como bacterias u hongos que expresan un factor de coagulación recombinante. Los métodos para activar zimógenos inicialmente inactivos de los diferentes factores de coagulación son bien conocidos por el experto en la materia. Cuál factor de coagulación activado se adiciona a la mezcla de reacción depende del anticoagulante que va a determinarse.

En una modalidad del método de la invención, el factor de coagulación proteolíticamente activo tiene una primera contraparte de enlazamiento X de un par de enlazamiento X/Y, y el primer componente del sistema productor de señal se asocia con la segunda contraparte de enlazamiento Y del par de enlazamiento X/Y, por lo cual el factor de coagulación proteolíticamente activo, debido al enlazamiento de las contrapartes de enlazamiento X e Y, está enlazado al primer componente del sistema formador de señal o se enlazará al primer componente del sistema formador de señal durante la incubación de la mezcla de reacción.

Las contrapartes de enlazamiento X e Y son dos moléculas diferentes que se reconocen y se enlazan una a la otra de manera específica. Ejemplos de reconocimiento y enlazamiento específicos son interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones de polinucleótido, etc.

Pares de enlazamiento adecuados X/Y son ante todo combinaciones de antígeno/anticuerpo, en cuyo caso la contraparte de enlazamiento X es un epítoto antigénico del factor de coagulación proteolíticamente activo. El epítoto antigénico puede ser un epítoto de secuencia natural o un epítoto estructural de la proteína natural. El epítoto antigénico también puede ser una secuencia heteróloga o un epítoto estructural de un factor de coagulación activo modificado. Ejemplos de secuencia heteróloga o de epítoto estructural son etiquetas FLAG, o HIS o de fluoresceína, que se utilizan principalmente para etiquetar péptidos o proteínas. Otros pares adecuados de enlazamiento X/Y son polinucleótidos complementarios X e Y. La contraparte de enlazamiento Y, asociada con el primer componente del sistema formador de señales, debe escogerse de tal modo que pueda enlazarse específicamente con el factor de coagulación proteolíticamente activo. De manera preferida, la contraparte Y consiste en un anticuerpo o en un fragmento del mismo que enlaza antígeno. Pares de enlazamiento particularmente preferidos X/Y son etiqueta FLAG/etiqueta anti-FLAG-anticuerpo, etiqueta HIS /etiqueta anti-HIS-anticuerpo, fluoresceína/anti-fluoresceína-anticuerpo, biotina/avidina y biotina/estreptavidina.

En otra modalidad del método de la invención, el factor de coagulación proteolíticamente activo está enlazado mediante un enlace covalente con el primer componente del sistema formador de señal.

En otra modalidad, el ligando que se adiciona a la mezcla de reacción tiene una primera contraparte de enlazamiento A de un primer par de enlazamiento A/B para enlazarse al segundo componente del sistema formador de señal el cual tiene convenientemente la segunda contraparte B del par de enlazamiento A/B. De modo particularmente preferido, el ligando tiene al menos un residuo de biotina como contraparte de enlazamiento A.

Las contrapartes de enlazamiento A y B son dos moléculas diferentes que se reconocen y se enlazan específicamente una a la otra. Ejemplos de reconocimiento y enlazamiento específicos son interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones de polinucleótido, etc.

Pares adecuados de enlazamiento A/B son ante todo combinaciones de antígeno/anticuerpo, en cuyo caso la contrapartes de enlazamiento A es un epítoto antigénico del ligando. El epítoto antigénico puede ser un epítoto de secuencia o de estructura de una proteína natural o de un fragmento de proteína. El epítoto antigénico también puede ser un epítoto heterólogo de secuencia o de estructura de un péptido modificado. Ejemplos de epítoto heterólogo de secuencia o de estructura son etiquetas FLAG, o HIS o fluoresceína, que se utilizan principalmente para etiquetar sustancias de bajo peso molecular, péptidos o proteínas. Otros pares adecuados de enlazamiento A/B son polinucleótidos complementarios A y B. La contraparte de enlazamiento B, asociada con el segundo componente del sistema formador de señal, debe seleccionarse de tal modo que el ligando pueda enlazarse de modo específico. De manera preferida, la contraparte de enlazamiento B se compone de un anticuerpo o de un fragmento del mismo que forma antígeno. Pares de enlazamiento particularmente preferidos A/B son etiqueta FLAG/etiqueta anti-FLAG- anticuerpo, etiqueta HIS/etiqueta anti-HIS-anticuerpo, fluoresceína/anti-fluoresceína-anticuerpo, biotina/avidina y biotina/estreptavidina.

Un par de enlazamiento posible A/B para asociación de ligando con el segundo componente formador de señal debe escogerse básicamente de tal modo que no interfiera con un segundo par de enlazamiento posible X/Y para la asociación del factor de coagulación proteolíticamente activo con el primer componente formador de señal debido a un enlazamiento mutuo.

- 5 Una ventaja de la presente invención es que el ligando usado puede, pero no necesita, tener una segunda contraparte artificial de enlazamiento de un par de enlazamiento.

En el contexto de la presente invención, por el término "sistema formador de señal" debe entenderse un sistema que comprende al menos un primero y un segundo componente los cuales interactúan de tal manera que surge una señal detectable cuando se llevan a proximidad espacial entre sí.

- 10 En una modalidad los componentes del sistema formador de señal son fases sólidas en forma de partículas, por ejemplo partículas de látex cuya aglutinación se determina por medio de turbidimetría o nefelometría. Para este propósito, el primer componente del sistema formador de señal consiste en una primera fase sólida en forma de partículas cuya naturaleza es tal que está asociada o es asociable con el factor de coagulación proteolíticamente activo. La primera fase sólida en forma de partículas puede conectarse con el factor de coagulación proteolíticamente activo por medio de un enlace covalente o por medio de un par de enlazamiento X/Y o será capaz de conectarse al mismo por medio de un par de enlazamiento X/Y en la mezcla de reacción. Además, el segundo componente del sistema formador de señal consiste en una segunda fase sólida en forma de partículas cuya naturaleza es tal que está asociada o es asociable con el ligando. La segunda fase sólida en forma de partículas puede estar enlazada con el ligando por medio de un enlace covalente o por medio de un par de enlazamiento A/B o está enlazada mediante un par de enlazamiento A/B en la mezcla de reacción. Los inmunoensayos basados en el principio de dispersión de la luz, intensificada por partículas, son conocidos desde aproximadamente 1920 (para una visión general véase Newman, D.J. et al., Particle enhanced light scattering immunoassay. Ann Clin Biochem 1992; 29: 22-42). Preferiblemente se utilizan partículas de poliestireno con un diámetro de 0,1 a 0,5 µm, particularmente preferible con un diámetro de 0,15 a 0,35 µm. Preferiblemente se utilizan partículas de poliestireno con funciones carboxilo o aldehído. Además se utilizan preferiblemente partículas de tipo cáscara/núcleo. Las síntesis de las partículas y acoplamiento covalente de ligandos se describe, por ejemplo, en Peula, J.M. et al., Covalent coupling of antibodies to aldehyde groups on polymer carriers. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1995; 6: 779-785.

- 30 En otra modalidad del método de la invención, el sistema formador de señal comprende al menos un primer o segundo componente que interactúan de tal manera que surge una señal detectable si se llevan a proximidad espacial entre sí y pueden entrar en interacción uno con otro. Por una interacción entre los componentes debe entenderse principalmente una transferencia de energía, es decir la transferencia directa de energía entre los componentes, por ejemplo mediante radiación lumínica o electrónica, así como por medio de una molécula química reactiva como, por ejemplo, oxígeno singlete de corta vida. La transferencia de energía puede efectuarse de un componente a otro pero también es posible una cascada de diferentes sustancias por medio de la cual se haga la transferencia de energía. Por ejemplo, los componentes pueden ser un par consistente en un donante de energía y un receptor de energía tales como, por ejemplo, agente de fotosensibilización y agente de quimioluminiscencia (EP-A2-0515194, LOCI® Technologie) o fotosensibilizador y fluoroforo (WO 95/06877) o yodo radioactivo <125> y fluoroforo (Udenfriend et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 8672 - 8676) o fluoroforo y agente para apagado de fluorescencia (US 3,996,345).

- 45 El primer componente y/o el segundo componente del sistema formador de señal que puede interactuar entre sí, pueden asociarse de modo covalente con una fase sólida en forma de partículas o mediante interacción específica o pueden incrustarse a la misma. Por el concepto de fase sólida en forma de partículas se entienden partículas capaces de suspenderse tales como, por ejemplo, soles metálicas, partículas de sílice, partículas magnéticas o especialmente preferible partículas de látex. Se prefieren partículas con un diámetro de 0,01 - 10 micrómetros, principalmente se prefieren partículas con un diámetro de 0,1 - 1 micrómetros.

- 50 El primer componente del sistema formador de señal cuyos componentes interactúan de tal manera que surge una señal detectable si se llevan a proximidad espacial uno del otro y pueden interactuar entre sí, tiene una naturaleza tal que se encuentra asociado o es capaz de asociarse con el factor de coagulación proteolíticamente activo. El primer componente del sistema formador de señal puede estar asociado o ser capaz de asociarse directamente con el factor de coagulación proteolíticamente activo. Preferiblemente, el primer componente del sistema formador de señal está asociado o es capaz de asociarse indirectamente con el factor de coagulación proteolíticamente activo. Para este propósito, el primer componente del sistema formador de señal está asociado con una fase sólida en forma de partículas la cual está asociada adicionalmente de modo covalente, o mediante un par de enlazamiento X/Y, con el factor de coagulación proteolíticamente activo, o es capaz de asociarse por medio de un par de enlazamiento X/Y.

El segundo componente del sistema formador de señal cuyos componentes interactúan de tal modo que surge una señal detectable cuando se llevan a proximidad espacial uno del otro y gracias a esto pueden entrar en interacción entre sí tiene una naturaleza tal que está asociado o es capaz de asociarse con el ligando. El segundo componente

del sistema formador de señal puede estar asociado o ser capaz de asociarse directamente con el ligando. Preferiblemente, el segundo componente del sistema formador de señal está asociado o es capaz de asociarse indirectamente con el ligando. Para este propósito, el segundo componente del sistema formador de señal está asociado con una fase sólida en forma de partículas, la cual está asociada adicionalmente de modo covalente o mediante un par de enlazamiento A/B con el ligando o es capaz de asociarse mediante un par de enlazamiento A/B.

En una modalidad preferida del método de la invención para determinar un inhibidor de un factor de coagulación proteolíticamente activo se mezcla la muestra adicionalmente con un inhibidor de agregación de fibrina. Los inhibidores de agregación de fibrina son sustancias que impiden la agregación de monómeros de fibrina inducidos por trombina. De esta manera se impide que aparezca un coágulo de fibrina en una muestra que contiene fibrinógeno, lo cual podría de otra manera tener un impacto negativo en la medición, un ejemplo limitando la difusión y la neutralización. Inhibidores de agregación de fibrina preferidos son péptidos sintéticos tales como, por ejemplo, un péptido de la secuencia glicina, prolina, arginina, prolina (disponible comercialmente como Pefabloc® FG, Pentapharm, Suiza). Otros péptidos preferidos que pueden utilizarse como inhibidores de agregación de fibrina, principalmente el péptido preferido de la secuencia glicina, prolina, arginina, prolina, alanina se describen en EP-A2-456 152.

En una modalidad preferida del método de la invención para determinar un inhibidor directo de un factor de coagulación proteolíticamente activo, a la mezcla de reacción adicionalmente se agrega una poliamina tal como Polybrene® (bromuro de hexadimetrina), espermina o polilisina. Las poliaminas inhiben la inhibición directa del factor de coagulación por heparinas. De esta manera, con el método de la invención puede distinguirse entre inducción por heparina e inhibición directa.

Después que se ha suministrado la mezcla de reacción que contiene la muestra, una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo, al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo pero no se disocia por el mismo en un enlace de péptido, y un primer y un segundo componente de un sistema formador de señal, la mezcla de reacción es incubada por un tiempo limitado a fin de asegurar suficiente asociación de factor de coagulación proteolíticamente activo, anticoagulante y ligando y, opcionalmente, del primer componente generador de señal con el factor de coagulación proteolíticamente activo y/o del segundo componente formador de señal con el ligando. El término "suficiente" debe entenderse de tal modo que el método permita enteramente una determinación cuantitativa de un inhibidor de un factor de coagulación proteolíticamente activo. La duración óptima de incubación de un diseño de ensayo especificado puede determinarse experimentalmente. Puede proporcionarse la mezcla de reacción en varios pasos individuales, en diferentes secuencias y diferentes tiempos de incubación.

La señal o la modificación de la señal como una función del tiempo que se produce en la mezcla de reacción se correlacionan con la actividad o la cantidad del inhibidor del factor de coagulación proteolíticamente activo. La actividad o la cantidad de un inhibidor del factor de coagulación proteolíticamente activo pueden establecerse por medio de dicha correlación con la ayuda de dicha señal o dicha modificación de señal en el tiempo. Para este fin se prefiere llevar a cabo una calibración usando un estándar. Dicho estándar posee una actividad o cantidad definidas del inhibidor del factor de coagulación proteolíticamente activo.

Otro objeto de la presente invención son los kits de ensayo para realizar las diferentes modalidades del método de la invención.

Un primer kit de ensayo contiene los siguientes componentes por separado:

- i. Un primer reactivo que comprende una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo;
- ii. Un segundo reactivo que contiene al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo pero no se disocia por éste en un enlace de péptido;
- iii. Un tercer reactivo que contiene un primer componente de un sistema formador de señal el cual es capaz de asociarse con el factor de coagulación proteolíticamente activo del primer reactivo; y
- iv. Un cuarto reactivo que contiene un segundo componente de un sistema formador de señal el cual es capaz de asociarse con el ligando del segundo reactivo.

Al usar un kit de ensayo de este tipo, cada componente se adiciona individualmente a la muestra o a la mezcla de reacción y tiene lugar la asociación del factor de coagulación proteolíticamente activo con el primer componente del sistema generador de señal y la asociación de ligando con el segundo componente del sistema generador de señal durante la incubación en la mezcla de reacción. Esto tiene la ventaja de que el tercero y cuarto reactivo pueden ser respectivamente un reactivo de detección capaz de utilizarse universalmente, en tanto que la asociación del factor de coagulación proteolíticamente activo o del ligando se efectúa por medio de pares de enlazamiento convencionales A/B o X/Y, por ejemplo mediante estreptavidina/biotina, avidina/biotina, etiqueta Flag /etiqueta anti-Flag-anticuerpo o similares.

Otro kit de ensayo contiene los siguientes componentes por separado:

- i. Un primer reactivo que contiene una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo, en cuyo caso el factor de coagulación proteolíticamente activo se encuentra asociado con un primer componente de un sistema formador de señal;
 - 5 ii. Un segundo reactivo que contiene al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo pero no es disociado por éste en un enlace de péptido; y
 - iii. Un tercer reactivo que contiene un segundo componente del sistema formador de señal el cual es capaz de asociarse con el ligando del segundo reactivo.
- 10 Al usar un kit de ensayo de este tipo sólo tiene lugar la asociación de ligando con el segundo componente del sistema formador de señal durante la incubación en la mezcla de reacción; el factor de coagulación proteolíticamente activo ya se encuentra asociado con el primer componente del sistema formador de señal.

Otro kit de ensayo contiene los siguientes componentes por separado:

- i. Un primer reactivo que contiene una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo;
 - 15 ii. Un segundo reactivo que contiene un primer componente de un sistema formador de señal el cual es capaz de asociarse con el factor de coagulación proteolíticamente activo del primer reactivo; y
 - iii. Un tercer reactivo que contiene al menos un ligando se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo, pero no se disocia por éste en un enlace de péptido, y en este caso el ligando se encuentra asociado con un segundo componente del sistema formador de señal.
- 20 Al usar un kit de ensayo de este tipo solamente tiene lugar la asociación del factor de coagulación proteolíticamente activo con el primer componente del sistema formador de señal durante la incubación en la mezcla de reacción; el ligando ya se encuentra asociado con el primer componente del sistema formador de señal.

Otro kit de ensayo contiene los siguientes componentes por separado:

- i. Un primer reactivo que contiene una cantidad definida de factor de coagulación proteolíticamente activo, en cuyo caso el factor de coagulación proteolíticamente activo se encuentra asociado con un primer componente de un sistema formador de señal; y
 - 25 ii. Un segundo reactivo que contiene al menos un ligando el cual se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo pero no es disociado por éste en un enlace de péptido, y en este caso el ligando está asociado con un segundo componente del sistema formador de señal.
- 30 Al usar un kit de ensayo de este tipo, tanto el factor de coagulación proteolíticamente activo como también el ligando se encuentran ya asociados con el respectivo componente del sistema formador de señal.

La ventaja de los kits de ensayo en los cuales el factor de coagulación proteolíticamente activo y/o el ligando ya se encuentran asociados con el respectivo componente generador de señal consiste, entre otras cosas en que se minimiza la cantidad de reactivos que van a utilizarse, gracias a lo cual se evitan etapas de dosificación con pipeta y se reduce el riesgo de riesgos de dosificación con pipeta.

35 Listado de abreviaturas

Ac Acilo-

Agm Agmantina

Ala Alanina

ANBA Ácido 5-amino-2-nitro-benzoico

40 Arg Arginina

B-f-P-R-H Biotinil-Ttds--D-Fe-Pro-Arg-H

Boc Carbonato de ter-butilo

B-r-P-R-H Biotinil-Ttds--D-Arg-Pro-Arg-H

Dpa β,β -Difenilalanina

f D-Fenilalanina

Gli Glicina

Gpa Guanidinofenilalanina

5 His Histidina

IPA Isopropilamida

Ki Constante de enlazamiento

Me Metil-

Ph Fenil-

10 Fe Fenilalanina

pNA para-nitroanilina

Pro Prolina

r D-Arginina

R Coeficiente de correlación

15 Tos Tosil-

Ttds Ácido 4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiaminosuccínico

Z-D-Leu Carbobenzoxi-D-leucina

Descripción de las figuras

Figura 1

20 Representación esquemática de un diseño de ensayo ejemplar para un diseño ejemplar de ensayo para un método según la invención para determinar inhibidores de trombina por medio de tecnología LOCI. Trombina proteolíticamente activa está enlazada a una fase sólida en forma de partículas que además están recubierta con un agente quimioluminiscente (Chemibead, CB). El segundo componente del sistema formador de señal está compuesto de una fase sólida en forma de partículas que se encuentra recubierta con un fotosensibilizador y además con estreptavidina (Sensibead, SB). Un ligando que se enlaza al centro activo de trombina pero no se disocia por ésta y la cual tiene una marcación con biotina y dicha marcación se enlaza a la estreptavidina del Sensibeads, acerca espacialmente ambos componentes del sistema formador de señal. La excitación del foto sensibilizado con la luz provoca la generación de oxígeno singlete de vida corta, el cual es capaz de activar el agente quimioluminiscente, gracias a lo cual se emite una señal luminiscente. Cuando más inhibidor de trombina (anticoagulante) se encuentre contenido en una muestra, el cual compite con el ligando biotinilado no disociable por el enlazamiento con la trombina, menor será la señal de luminiscencia que se genera.

Figura 2

35 Fórmula estructural del ácido biotinil-4,7,10-trioxa-13-tridecanaminamina succínico amino terminal (Biotinil-Ttds) conector del ligando específico de trombina biotinil-Ttds-D-Fe-Pro-Arg-H y del ligando específico del factor Xa biotinil-Ttds-D-Arg-Gly-Arg-H.

Figura 3

Determinación de la constante de enlazamiento de trombina de biotinil-Ttds-D-Fe-Pro-Arg-H (B-f-P-R-H). Representación de la dependencia inversa de la velocidad de reacción de la concentración de ligando en caso de concentraciones de sustrato cromogénicas de 4,2 y 0,5 mM en un ensayo de trombina según el ejemplo 2.

40 Figura 4

Determinación de la constante de enlazamiento de trombina de biotinil-Ttds-D-Fe-Pro-Arg-H (B-f-P-R-H). Fragmento agrandado de la figura 3.

Figura 5

5 Determinación de la constante de enlazamiento de trombina de Biotinil-Ttds-D-Arg-Gly-Arg-H (B-r-G-R-H). Representación de la dependencia del valor inverso de la velocidad de reacción de la concentración delegando en caso de concentraciones de sustrato cromogénicas de 4,2 y 0,5 mM en un ensayo de trombina según el ejemplo 2.

Figura 6

10 Determinación de la constante de enlazamiento de F Xa de biotinil-Ttds-D-Fe-Pro-Arg-H (B-f-P-R-H). Representación de la dependencia del valor inverso de la velocidad de reacción de la concentración delegando en caso de concentraciones de sustrato cromogénicas de 4, 2 y 0,5 mM en un ensayo de F Xa según el ejemplo 3.

Figura 7

15 Determinación de la constante de enlazamiento de F Xa de biotinil-Ttds-D-Arg-Gly-Arg-H (B-r-G-R-H). Representación de la dependencia del valor inverso de la velocidad de reacción de la concentración de ligando en caso de concentraciones cromogénicas de 4, 2 y 0,5 mM en un ensayo de F Xa según el ejemplo 3.

Figura 8

20 Generación de la señal de quimioluminiscencia en plasma humano estándar con diferentes concentraciones de los inhibidores de trombina fragmina, liquemina, argatroban, melagatran y refludan (hirudina), en cuyo caso el ligando biotinil-Ttds-D-Fe-Pro-Arg-H (B-f-P-R-H) fue empleado en conexión con Chemibeads recubiertas con trombina y Sensibeads recubiertas con estreptavidina.

Figura 9

25 Generación de señal de quimioluminiscencia en plasma humano estándar con diferentes concentraciones de los inhibidores de FXa fragmina, liquemina y rivaroxaban y de los inhibidores de trombina refludan (hirudina) y argatroban, en cuyo caso el ligando biotinil-Ttds-D-Arg-Gly-Arg-H (B-r-G-R-H) se empleó en conexión con Chemibeads recubiertas con anticuerpo anti-FXa, Sensibeads recubiertas con FXa y estreptavidina.

25 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben entenderse como una restricción.

Ejemplo 1: Síntesis de ligandos de trombina y factor Xa-biotinil-Ttds-aldehído de péptido

30 Los aldehídos de péptido -D-Fe-Pro-Arg-H (véase Claeson, G., Blood Coagulation and Fibrinolysis 5, 1994, página 417) y -D-Arg-Gly-Arg-H (compárese Claeson, G., Blood Coagulation and Fibrinolysis 5, 1994, página 426) fueron sintetizados sobre una fase sólida, se alargaron con un espaciador Ttds (Ttds = ácido 4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiamino succínico (Bartos, A. et al., 2009, Biopolymers 92(2), 110-115) y se les proporcionó biotina. El compuesto biotinil-Ttds-D-Fe-Pro-Arg-H tiene un peso molecular de 930,15 g/mol y se denomina brevemente en lo sucesivo B-f-P-R-H. El compuesto biotinil-Ttds-D-Arg-Gly-Arg-H tiene un peso molecular de 899,10 g/mol y en lo sucesivo se denomina brevemente B-r-G-RH. La disociación del aldehído de péptido de la fase sólida se efectuó con ácido trifluoroacético. Los compuestos se almacenaron a -20 °C en forma liofilizada. La estructura del conector biotina está representada en la figura 2.

Ejemplo 2: Determinación de las constantes de enlazamiento de trombina de los ligandos de aldehído de péptido

40 Los datos genéticos de los ligandos de aldehído de péptido se determinaron en formatos de ensayo cromogénicos midiendo la velocidad de la hidrólisis de sustratos de péptido cromogénicos los cuales compiten con los ligandos de aldehído de péptido por el enlazamiento al centro activo de la respectiva encima, en diferentes concentraciones de sustrato y concentraciones de ligando de aldehído de péptido. La constante de enlazamiento (K_i) se determinó según un método conocido (Dixon, M., 1953, Biochem J, 55, 170-171).

45 La determinación de la constante de enlazamiento de trombina se realizó con los reactivos del ensayo de actividad de hirudina de Siemens Healthcare Diagnostics. El ensayo de actividad de hirudina consiste en un reactivo liofilizado de trombina compuesto por trombina bovina, un inhibidor de heparina y aprotinina, un reactivo de sustrato cromogénico liofilizado con una concentración de 4 mmol/L de tos-Gli-Pro-Arg-ANBA-IPA (tosilglicil-L-propil-arginil-5-amino-2-nitrobenzoilisopropilamida) después de reconstitución. El reactivo de trombina se reconstituyó en solución reguladora de pH (trishidroximetilaminometano, NaCl, pH 8,2). Se prepararon diluciones del reactivo de sustrato con agua desionizada. Los ligandos de aldehído de péptido, preparados según el ejemplo 1, se disolvieron en agua y se emplearon como muestra. El ligando Br-G-R-H se utilizó en un intervalo de concentraciones desde 26,1 hasta 0,815 μM. El ligando B-f-P-R-H se utilizó en un intervalo de concentraciones desde 26,1 hasta 0 μM. la realización de los

ES 2 574 303 T3

ensayos se efectúa automáticamente en un analizador de coagulación BCS® XP (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania).

Una mezcla de reacción fue mezclada conjuntamente tal como sigue:

30 µl de muestra (ligando de aldehído de péptido B-r-G-R-H o B-f-P-R-H),

5 150 µl de reactiva de trombina,

50 µl de reactivo de sustrato cromogénico (tos-Gli-Pro-Arg-ABNA-IPA).

10 Por medio del incremento de la densidad óptica de la mezcla de reacción a una longitud de onda de 405 nm se determinó la velocidad de reacción en mE/min. La densidad óptica de la mezcla de reacción se determinó a intervalos de tiempo de 15 hasta 40 segundos para el ligando de aldehído de péptido B-f-P-R-H o de 5-16 segundos para el ligandos dialdehído de péptido B-r-G-R-H.

15 Los ligandos de enlazamiento reversible e irreversible pueden distinguirse por su cinética de reacción. Graficando $1/v$, en cuyo caso v es la velocidad de reacción, frente a la concentración de ligando (i) a una concentración constante (S) de un sustrato disociable se obtiene una línea recta. Al usar dos o más concentraciones diferentes de sustrato ($S_1, S_2... S_N$), dichas líneas intersecan en un solo punto. El valor del eje x de este punto corresponde a $-K_i$, donde K_i corresponde la constante de enlazamiento; véase, por ejemplo, Klebe, G., Wirkstoffdesign (Diseño de sustancias), segunda edición, editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009, páginas 52-62 y Dixon, M., 1953, Biochem J, 55, 170-171). En caso de una inhibición irreversible las curvas se encuentran en un punto sobre las arcillas el cual corresponde nuevamente a $-K_i$.

20 La tabla 2 muestra las concentraciones utilizadas en el ligandos de aldehído de péptido B-f-P-R-H, así como los valores inversos de las velocidades de reacción obtenidas con las diferentes concentraciones del sustrato cromogénico.

Tabla 2

CB-f-P-R-H [µM]	1/velocidad de reacción [min/E]		
	CSustrato = 4 mM	CSustrato = 2 mM	CSustrato = 0,5 mM
26,08696	14,58931	28,40843	121,67418
16,30435	9,30221	18,08682	74,54798
13,04348	7,61108	14,42763	59,11941
9,78261	5,84267	11,17905	43,90039
6,52174	4,08943	7,85565	32,28213
5,21739	3,25123	6,16548	24,75736
3,26087	2,13002	4,02645	15,77139
2,60870	1,77535	3,36951	13,19230
1,63043	1,18258	2,16372	8,49129
1,30435	0,99739	1,79279	7,17521
0,81522	0,72743	1,16912	4,77479
0,65217	0,67366	1,02929	4,16189
0,40761	0,53337	0,70084	2,64461
0,32609	0,50125	0,66133	2,38165
0,20380	0,42975	0,50607	1,63785
0,16304	0,43955	0,52101	1,71097
0,08152	0,41427	0,45943	1,56479
0,04076	0,39301	0,42471	1,74741
0,02038	0,38457	0,41376	1,86941
0	0,38254	0,41286	1,93034

25 Las curvas de regresión se graficaron en la región lineal de los gráficos de $1/\text{velocidad de reacción}$ como una función de la concentración de ligando ($C_{B-f-P-R-H}$) a las diferentes concentraciones de sustrato (figuras 3 y 4). Para $C_{\text{sustrato}} = 0,5$ mM, las concentraciones desde 0 hasta 0,04076 µM no estaban en la región lineal y por lo tanto se excluyeron. Se calcularon tres valores de K_i de las intersecciones de las curvas de regresión y de estos tres se calcularon luego un valor de K_i promedio y las intersecciones de los gráficos. De los valores de K_i obtenidos de esta manera se

30 calculó el valor medio K_i (tabla 3). Puesto que las intersecciones de las curvas de regresión no están sobre el eje x , el enlazamiento del aldehído de péptido con trombina es reversible. La constante de enlazamiento de trombina promedio K_{iM} del ligando de aldehído de péptido B-f-P-R-H es de 0,131 µmol ($1,31 \times 10^{-7}$ Mol). Puesto que las constantes de enlazamiento de los medicamentos relevantes (inhibidores de trombina, terapéuticamente efectivos y adecuados) son más grandes, el compuesto de acuerdo con el método descrito, usando trombina como enzima activa de coagulación, es adecuado para detectar inhibidores de trombina de alta afinidad.

Tabla 3

Constante de enlazamiento de trombina (K_i) de B-f-P-R-H				
C _{Sustrato} (mM)	Pendiente (min/E μ M)	Fragmento de eje (min/E)	R ₂	K_i (μ M)
4	0,5500	0,3497	0,9997	$K_{i1\&2}=0,106$
2	1,0812	0,04059	0,9997	$K_{i1\&3}=0,141$
0,5	4,5718	0,9175	0,9994	$K_{i2\&3}=0,147$
K _i medio:				$K_{iM}=0,131$

La tabla 4 muestra las concentraciones utilizadas en la mezcla de reacción del ligando de aldehído de péptido B-r-G-RH y los valores inversos de las velocidades de reacción obtenidas con las diferentes concentraciones del sustrato cromogénico.

5

Tabla 4

CB-r-G-R-H [μ M]	1/Velocidad de reacción [min/E]		
	C _{Sustrato} = 4 mM	C _{Sustrato} = 2 mM	C _{Sustrato} = 0,5 mM
26,08696	0,39497	0,42847	0,69034
16,30435	0,38645	0,41405	0,62639
13,04348	0,38853	0,40320	0,60905
9,78261	0,38047	0,41056	0,58021
6,52174	0,38410	0,40077	0,56372
5,21739	0,37614	0,39456	0,54078
3,26087	0,38074	0,39679	0,53851
2,60870	0,37303	0,38756	0,52827
1,63043	0,37478	0,38938	0,52245
1,30435	0,37579	0,39024	0,52112
0,81522	0,37556	0,38842	0,51597

Las curvas de regresión se graficaron en la región lineal de los gráficos 1/velocidad de reacción frente a la concentración de ligando ($C_{B-r-G-R-H}$) a las diferentes concentraciones de sustrato (figura 5). De las intersecciones de las curvas de regresión se calcularon tres valores de K_i y de estas se calculó luego un valor promedio K_i y las intersecciones de los gráficos. A partir de los valores de K_i obtenidos de esta manera se calculó el valor medio de K_i (tabla 5). Puesto que las intersecciones de las curvas de regresión no están sobre el eje x, el enlazamiento del aldehído de péptido con trombina es reversible. La constante de enlazamiento de trombina promedio K_{iM} del ligando de aldehído de péptido B-r-G-R-H es de 20,9 μ mol ($2,09 \times 10^{-5}$ Mol). El ligando es adecuado por lo tanto de acuerdo con el método descrito, usando trombina como enzima activa de coagulación para determinar incluso inhibidores de trombina de baja afinidad.

10

15

Tabla 5

Constante de enlazamiento de trombina (K_i) de B-r-G-R-H				
C _{Sustrato} (mM)	Pendiente (min/E μ M)	Fragmento de eje (min/E)	R ₂	K_i (μ M)
4	0,000805	0,3746	0,8520	$K_{i1\&2}=17,4$
2	0,001572	0,3880	0,9246	$K_{i1\&3}=22,3$
0,5	0,006964	0,5122	0,9544	$K_{i2\&3}=23,0$
K _i medio:				$K_{iM}=20,9$

Ejemplo 3: Determinación de las constantes de enlazamiento de F Xa de los ligandos de aldehído de péptido

La determinación de la constante de enlazamiento de F Xa se realizó con los reactivos del ensayo de heparina Berichrom® de Siemens Healthcare Diagnostics. El ensayo de heparina Berichrom® está compuesto de:

20

- un reactivo de F Xa que se compone de una fracción de plasma liofilizada la cual contiene el factor Xa, y de aditivos tales como Tris, NaCl, EDTA y agentes preservantes,

- un reactivo de sustrato cromogénico (Z-D-Leu-Gli-Arg-ANBA-metil-amida),

25

- un reactivo de dilución para reconstitución, y

- un reactivo sulfato de dextrano compuesto de sulfato de dextrano liofilizado.

ES 2 574 303 T3

Después de la reconstitución en 10 ml de reactivo de dilución, la concentración de sulfato de dextrano es de 0,02 g/l. El reactivo F Xa se reconstituye con el reactivo de sulfato de dextrano reconstituido. El reactivo de sustrato contiene después de reconstitución con 2 ml de agua desionizada 4 mmol/L de Z-D-Leu-Gli-Arg-ANBA-metil-amida. Se prepararon diluciones del reactivo de sustrato con agua desionizada. Los ligandos de péptido de aldehído preparados según el ejemplo 1 se disolvieron en agua y se usaron como muestra. La realización de los ensayos se efectúa automáticamente en un analizador de coagulación BCS® XP (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemania).

Una mezcla de reacción se mezcló conjuntamente tal como sigue:

20 µl de agua,

10 15 µl de muestra (ligando aldehído de péptido B-r-G-R-H o B-f-P-R-H),

15 ml de agua,

150 µl de reactivo de F Xa,

30 µl de reactivo de sustrato (Z-D-Leu-Gli-Arg-ANBA-metil-amida).

15 Mediante el incremento de la densidad óptica de la mezcla de reacción a una longitud de onda de 405 nm se determinó la velocidad de reacción en mE/min. Para este propósito se determinó la densidad óptica de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 10 a 70 segundos.

La tabla 6 muestra las concentraciones del ligando aldehído de péptido B-f-P-R-H, empleadas en la mezcla de reacción, así como los valores inversos de las velocidades de reacción obtenidas con las diferentes concentraciones del sustrato cromogénico.

20

Tabla 6

C _{B-f-P-R-H} [µM]	1/Velocidad de reacción [min/E]		
	C _{Sustrato} = 4 mM	C _{Sustrato} = 2 mM	C _{Sustrato} = 0,5 mM
13,04348	1,35879	2,49937	9,73911
8,15217	1,17310	2,14879	8,37740
6,52174	1,10558	1,97908	7,61262
4,89130	1,02567	1,83999	7,08399
3,26087	0,94477	1,71517	6,66273
2,60870	0,93172	1,67166	6,44104
1,63043	0,90212	1,59083	6,26347
1,30435	0,87349	1,56215	5,95893
0,81522	0,84935	1,52113	5,86778
0,65217	0,85137	1,50973	5,78490
0,40761	0,83380	1,48916	5,69390
0,32609	0,83198	1,48552	5,68996
0,20380	0,82383	1,47333	5,61861
0,16304	0,83329	1,48487	5,67486
0,10190	0,81565	1,46315	5,61945
0,08152	0,82180	1,46678	5,57154
0,04076	0,81738	1,45442	5,56930
0,02038	0,81918	1,45743	5,56461
0,01019	0,82168	1,45734	5,61679
0	0,83042	1,47267	5,68282

25 Las curvas de regresión se graficaron en la región lineal de los gráficos de 1/velocidad de reacción como una función de la concentración de ligando (C_{B-f-P-R-H}) a las diversas concentraciones de sustrato (figura 6). De las intersecciones de las curvas de regresión se calcularon tres valores de K_i y a partir de estos se calculó luego un valor medio de K_i y las intersecciones de los gráficos. A partir de los valores de K_i obtenidos de esta manera, se calculó el valor medio de K_i (tabla 7). Puesto que las intersecciones de las curvas de regresión no están en el eje x, el enlazamiento de aldehído de péptido con F Xa es reversible. La constante de enlazamiento media de F Xa K_{IM} del ligando de aldehído de péptido B-f-PR-H es de 16,9 µmol (1,69 x 10⁻⁵ Mol). El indicando es adecuado por lo tanto según el método descrito, usando F Xa como enzima activa de coagulación, para determinar inhibidores de F Xa de baja afinidad.

30

Tabla 7

Constante de enlazamiento de F Xa (K _i) de B-f-P-R-H				
CSustrato (mM)	Pendiente (min/E μM)	Fragmento de eje (min/E)	R2	K _i (μM)
4	0,0421	0,8202	0,9975	K _{i1&2} =16,6
2	0,0806	1,4588	0,9987	K _{i1&3} =17,
0,5	0,3216	5,5934	0,9965	K _{i2&3} =17,2
K _i medio:				K _{iM} =16,9

La tabla 8 muestra las concentraciones del ligando aldehído de péptido B-r-G-RH, empleadas en la mezcla de reacción, así como los valores inversos de las velocidades de reacción obtenidas con las diferentes concentraciones de sustrato cromogénicas.

Tabla 8

C _{B-r-G-R-H} [μM]	1/Velocidad de reacción [min/E]		
	C _{Sustrato} = 4 mM	C _{Sustrato} = 2 mM	C _{Sustrato} = 0,5 mM
13,04348	8,46963	19,61291	98,11308
8,15217	5,66889	12,99196	62,32312
6,52174	4,81865	10,44658	52,69400
4,89130	3,74536	8,24448	37,79438
3,26087	2,72840	5,52006	26,41568
2,60870	2,27442	4,62654	20,14413
1,63043	1,67882	3,14700	13,97126
1,30435	1,47587	2,80172	12,04614
0,81522	1,17709	2,11479	8,40260
0,65217	1,09950	1,97479	7,75440
0,40761	0,92591	1,65890	6,40799
0,32609	0,90610	1,61219	6,12959
0,20380	0,82623	1,45744	5,52072

Las curvas de regresión se graficaron en la región lineal de los gráficos de 1/velocidad de reacción como una función de la concentración de ligando (C_{B-r-G-R-H}) a las diferentes concentraciones de ligando (figura 7). A partir de las intersecciones de las curvas de regresión se calcularon tres valores K_i y a partir de estos se calculó un valor medio K_i y las intersecciones de los gráficos. A partir de los valores de K_i obtenidos de esta manera se calculó el valor medio de K_i (tabla 9). Puesto que las intersecciones de las curvas de regresión no se encuentran sobre el eje X (de las abscisas), el enlazamiento del aldehído de péptido con F Xa es reversible. La constante de enlazamiento de F Xa K_{iM} del ligando aldehído de péptido B-r-G-RH es de 0,332 μmol (3,32 x 10⁻⁷ Mol). Puesto que las constantes de enlazamiento de los medicamentos relevantes (inhibidores de F Xa terapéuticamente efectivos y adecuados) son más grandes, el compuesto de acuerdo con el método descrito, usando F Xa como enzima activa de coagulación, es adecuado para detectar inhibidores de F Xa de alta afinidad.

Tabla 9

Constante de enlazamiento de F Xa (K _i) de B-r-G-R-H				
CSustrato (mM)	Pendiente (min/E μM)	Fragmento de eje (min/E)	R2	K _i (μM)
4	0,6037	0,7187	0,9992	K _{i1&2} =0,358
2	1,4375	1,0169	0,9992	K _{i1&3} =0,321
0,5	7,3110	2,8743	0,9987	K _{i2&3} =0,316
K _i medio:				K _{iM} =0,332

Ejemplo 4: Método según la invención para determinar inhibidores de trombina por medio de reactivos LOCI

Como muestras se utilizaron plasma humano estándar y plasma humano estándar al cual se adicionaron concentraciones crecientes de inhibidores de trombina directos (hirudina, melagatran, argatroban) o indirectos (liquemina, fragmina).

Como sistema formador de señal se utilizó el sistema LOCI® que se compone de un compuesto quimioluminiscente (2-(4-(N,N, di-tetradecil)-anilino-3-fenil tioxeno) y un fotosensibilizador (bis-(trihexil)-silicon-t-butiltalocianina). Tanto el compuesto quimioluminiscente como también el fotosensibilizador están acoplados a las partículas de látex. En lo sucesivo también se utilizan los términos "Chemibeads" para las partículas recubiertas con el compuesto quimioluminiscente y "Sensibeads" para las partículas recubiertas con el fotosensibilizador. La tecnología LOCI aquí

utilizada se basa en que el compuesto quimioluminiscente acoplado a las partículas de látex (Chemibeads) y el fotosensibilizador acoplado a las partículas de látex (Sensibeads) se aproximan espacialmente uno al otro mediante un enlace con un analito, de modo que el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador puede excitar al compuesto quimioluminiscente.

- 5 Las Chemibeads aquí utilizadas se recubren adicionalmente con trombina bovina. Para este propósito la trombina bovina se enlazó de modo covalente con las partículas de látex. Las Sensibeads aquí utilizadas se recubrieron adicionalmente con estreptavidina.

En calidad de ligandos se utilizó el aldehído de péptido biotinilido biotinil-Ttds-D-Fe-Pro-Arg-H (B-f-P-R-H).

- 10 En ausencia de un inhibidor de trombina, el ligando se enlaza a través de su residuo de biotina con las Sensibeads recubiertas de estreptavidina y, por medio de su parte de péptido, con las Chemibeads recubiertas con trombina y se genera una señal quimioluminiscente (véase también la figura 1). En presencia de un inhibidor de trombina que compite con el ligando por el enlace a las Chemibeads recubiertas de trombina, pero que no puede enlazarse a las Sensibeads, la señal de quimioluminiscencia es inversamente proporcional a la concentración de inhibidor de trombina.

- 15 Respectivamente se combinaron 2 µl de muestra, 10 µl del péptido inhibidor de polimerización de fibrina glicina-prolina-argina-prolina (10 mg/ml), 20 µl de Chemibeads (400 µg/ml) y 10 µl del ligando (1,25 µM) se incubaron durante 6 minutos. Después de adicionar 20 µl de Sensibeads (600 µg/ml) y una incubación de 10 minutos, la mezcla se completó con agua hasta 250 µl y se midió la señal de quimioluminiscencia. Tal como se muestra en la figura 8, la señal de quimioluminiscencia se disminuye dependiendo del tipo y de la concentración de los inhibidores de trombina directos, dosificados. Las heparina (liquemina, fragmina), también dosificadas, que inhiben trombina indirectamente, conducen a una disminución ostensible de la señal de quimioluminiscencia.

Ejemplo 5: Método según la invención para determinar inhibidores del factor Xa por medio de reactivos LOCI

- 25 Como muestras se utilizaron plasma humano estándar y plasma humano estándar al cual se adicionaron concentraciones crecientes de inhibidores de trombina directos o indirectos (hirudina, argatroban, liquemina) o de factor Xa (rivaroxaban, liquemina, fragmina).

Como sistema formador de señal se utilizó el sistema LOCI según el ejemplo 4.

- 30 Las Chemibeads se recubrieron adicionalmente con un anticuerpo policlonal comercialmente disponible contra FXa. Para este propósito se enlazó el anticuerpo de modo covalente con las partículas de látex en una proporción de acoplamiento de 10 mg de anticuerpo a 50 ng de partículas. Las Sensibeads aquí utilizadas se recubrieron adicionalmente con estreptavidina.

Como ligando se utilizó el aldehído de péptido biotinilado biotinil-Ttds-D-Arg-Gli-Arg-H (B-r-G-R-H).

- 35 En ausencia de un inhibidor de Fxa el ligando se enlaza a través de su residuo de biotina con las Sensibeads recubiertas de estreptavidina y a través de su parte de péptido con el FXa, el cual se enlaza a las Chemibeads recubiertas con anticuerpo, y se genera una señal de quimioluminiscencia (véase también la figura 1). En presencia de un inhibidor de F Xa que compite con el ligando para enlazarse a las Chemibeads recubiertas con F Xa, pero que no puede enlazarse a las Sensibeads, la señal de quimioluminiscencia es inversamente proporcional a la concentración de inhibidor de FXa (por ejemplo, rivaroxaban). En presencia de un inhibidor de trombina (por ejemplo, argatroban o hirudina) por lo contrario la señal no se reduce puesto que el inhibidor de trombina no puede desplazar al ligando. Dagegen das Signal nicht reduziert, da der

- 40 Se mezclaron 10 µl de un reactivo que contiene F Xa humano (aproximadamente 1.000 IU/L) y péptido inhibidor de polimerización de fibrina glicina-prolina-argina-prolina (10 mg/ml) con 2 µl de muestra, 20 µl de Chemibeads (400 µg /mL) y 10 µl del ligando (6 µM) y se incubaron por 5 minutos. Después de adicionar 60 µl de Sensibeads (200 µg/ml) y una incubación de 10 minutos, la mezcla se llenó con agua hasta 260 µl y se midió la señal de quimioluminiscencia. Tal como se muestra en la figura 9, la señal de quimioluminiscencia disminuye dependiendo del tipo y de la concentración de los inhibidores directos dosificados de F Xa y de trombina. Heparina (liquemina, fragmina), que también se dosificaron y que inhiben indirectamente a FXa, conducen a una disminución ostensible de la señal de quimioluminiscencia.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar un inhibidor de un factor de coagulación proteolíticamente activo en una muestra, el cual comprende los pasos de:
- a) proporcionar e incubar una mezcla de reacción que contiene
- 5 i. una alícuota de la muestra
- ii. una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo,
- iii. al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo, pero no es disociado por éste en un enlace de péptido,
- 10 iv. un primero y segundo componente de un sistema generador de señal los cuales interactúan de tal manera que surge una señal detectable si el primero y segundo componente del sistema formador de señal se llevan a proximidad espacial uno del otro y, en cuyo caso, el factor de coagulación proteolíticamente activo está asociado con el primer componente del sistema formador de señal o se asociará durante la incubación, y el ligando está asociado con el segundo componente del sistema formador de señal o se asociará durante la incubación;
- b) medir la señal del sistema formador de señal, en cuyo caso la altura de la señal es inversamente proporcional a la concentración de inhibidor en la muestra.
- 15
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en cuyo caso el ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo tiene una afinidad de enlazamiento de $K_i = 10^{-13}$ hasta 10^{-4} M para el factor de coagulación proteolíticamente activo.
3. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en cuyo caso el primero y segundo componente del sistema formador de señal comprenden respectivamente una fase sólida en forma de partículas, y la aglutinación de las fases sólidas en forma de partículas se mide en la mezcla de reacción.
- 20
4. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en cuyo caso el primer componente del sistema formador de señal es un agente quimioluminiscente y el segundo componente del sistema formador de señal es un fotosensibilizador o viceversa y en cuyo caso la quimioluminiscencia se mide en la mezcla de reacción.
- 25
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en cuyo caso el agente quimioluminiscente está asociado con una primera fase sólida en forma de partículas y/o el fotosensibilizador está asociado con una segunda fase sólida en forma de partículas.
6. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en cuyo caso el ligando tiene una primera contraparte de enlazamiento A de un primer par de enlazamiento A/B y en cuyo caso el segundo componente del sistema formador de señal tiene la segunda contraparte de enlazamiento B del primer par de enlazamiento A/B y el segundo componente del sistema formador de señal tiene la segunda contraparte de enlazamiento B del primer par de enlazamiento A/B y el ligando se encuentra asociado mediante enlace de las contrapartes de enlazamiento A y B con el segundo componente del sistema formador de señal o se asociará durante la incubación.
- 30
7. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en cuyo caso el ligando es un derivado de péptido.
- 35
8. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en cuyo caso el ligando es un derivado de péptido que tiene un grupo terminal carboxilo del grupo de aldehído, cetona, trifluorometilcetona, ácido α -cetocarboxílico, α -cetoamida, α -cetoésteres, ésteres, ácido borónico, clorometilcetona y fluoruro de sulfonilo.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en cuyo caso las contrapartes de enlazamiento A y B se seleccionan de tal manera que forman un par de enlazamiento A/B del grupo de etiqueta FLAG/anticuerpo etiqueta anti-FLAG, etiqueta HIS/anticuerpo etiqueta anti-HIS, fluoresceína/anticuerpo anti-fluoresceína, biotina/avidina y biotina/estreptavidina.
- 40
10. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en cuyo caso el factor de coagulación proteolíticamente activo tiene una primera contraparte de enlazamiento X de un segundo par de enlazamiento X/Y y la segunda contraparte de enlazamiento Y del segundo par de enlazamiento X/Y se encuentra asociada con el primer componente del sistema formador de señal y el factor de coagulación proteolíticamente activo está asociado mediante enlace de las contrapartes de enlazamiento X e Y con el primer componente del sistema formador de señal o se asociará durante la incubación.
- 45

11. Método según una de las reivindicaciones precedentes para determinar un inhibidor de trombina, en cuyo caso se proporciona y se incuba una mezcla de reacción que contiene una cantidad definida del factor de coagulación proteolíticamente activo trombina.
- 5 12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, en cuyo caso se proporciona y se incuba una mezcla de reacción que contiene el péptido biotinil-Ttds-D-Fe-Pro-Arg-H, el cual se enlaza reversible mente al centro activo de trombina pero no se disocia por éste.
13. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 o 12 para determinar un inhibidor de trombina del grupo de heparina, derivados de heparina, bivalirudina, hirudina, dabigatran, argatroban, melagatran, ximelagatran, lepirudina, MCC-977, SSR-182289, TGN-255, TGN-167, ARC-183 y odiparcil.
- 10 14. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10 para determinar un inhibidor de factor Xa, en cuyo caso se proporciona y se incuba una mezcla de reacción que contiene una cantidad definida del factor de coagulación proteolíticamente activo factor Xa.
- 15 15. Método de acuerdo con la reivindicación 14 para determinar un inhibidor de factor Xa del grupo de heparina, derivados de heparina tales como fondaparinux, rivaroxaban, apixaban, otamixaban, LY 517717, YM 153, DU-176b, DX-9065a y KFA-1982.
16. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 o 15, en cuyo caso se proporciona y se incuba una mezcla de reacción que contiene el péptido biotinil-Ttds-D-Arg-Gli-Arg-H, el cual se enlaza reversiblemente al centro activo de factor Xa, pero no es disociado por éste.
- 20 17. Kit de ensayo para realizar un método según una de las reivindicaciones 1 a 16, en cuyo caso el kit de ensayo contiene por separado los siguientes componentes:
- i. Un primer reactivo que contiene una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo;
- ii. Un segundo reactivo que contiene al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo pero no se disocia por éste en un enlace de péptido;
- 25 iii. Un tercer reactivo que contiene un primer componente de un sistema formador de señal, el cual es capaz de asociarse con el factor de coagulación proteolíticamente activo del primer reactivo; y
- iv. Un cuarto reactivo que contiene un segundo componente de un sistema formador de señal el cual es capaz de asociarse con el ligandos del segundo reactivo;
- 30 en cuyo caso el primero y segundo componente del sistema formador de señal interactúan de tal manera que surge una señal detectable si el primero y el segundo componente del sistema formador de señal se llevan a proximidad espacial uno del otro.
18. Kit de ensayo para realizar un método según una de las reivindicaciones 1 a 16, en cuyo caso el kit de ensayo contiene por separado los siguientes componentes:
- i. Un primer reactivo que contiene una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo, en cuyo caso el factor de coagulación proteolíticamente activo está asociado con un primer componente de un sistema formador de señal;
- 35 ii. Un segundo reactivo que contiene al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo pero no se disocia por éste en un enlace de péptido; y
- iii. Un tercer reactivo que contiene un segundo componente del sistema formador de señal el cual es capaz de asociarse con el ligando del segundo reactivo;
- 40 en cuyo caso el primero y segundo componente del sistema formador de señal interactúan de tal modo que surge una señal detectable cuando el primero y segundo componente del sistema formador de señal se llevan a proximidad espacial uno del otro.
19. Kit de ensayo para realizar un método según una de las reivindicaciones 1 a 16, en cuyo caso el kit de ensayo contiene por separado los siguientes componentes:
- 45 i. Un primer reactivo que contiene una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo;
- ii. Un segundo reactivo que contiene un primer componente de un sistema formador de señal que es capaz de asociarse con el factor de coagulación proteolíticamente activo del primer reactivo; y

iii. Un tercer reactivo que contiene al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo pero no se disocia por éste en un enlace de péptido, y el ligando está asociado con un segundo componente del sistema formador de señal;

5 en cuyo caso el primero y segundo componente del sistema formador de señal interactúan de tal manera que surge una señal detectable cuando el primero y el segundo componente del sistema formador de señal se llevan a proximidad espacial uno del otro.

20. Kit de ensayo para realizar un método según una de las reivindicaciones 1 a 16, en cuyo caso el kit de ensayo contiene por separado los siguientes componentes:

10 i. Un primer reactivo que contiene una cantidad definida de un factor de coagulación proteolíticamente activo, en cuyo caso el factor de coagulación proteolíticamente activo está asociado con un primer componente de un sistema formador de señal; y

ii. Un segundo reactivo que contiene al menos un ligando que se enlaza al centro activo del factor de coagulación proteolíticamente activo, pero no se disocia por éste en un enlace de péptido, y el ligando está asociado con un segundo componente del sistema formador de señal;

15 en cuyo caso el primero y el segundo componente del sistema formador de señal interactúan de tal manera que surge una señal detectable, si el primero y segundo componente del sistema formador de señal se llevan a proximidad espacial uno del otro.

FIG 1

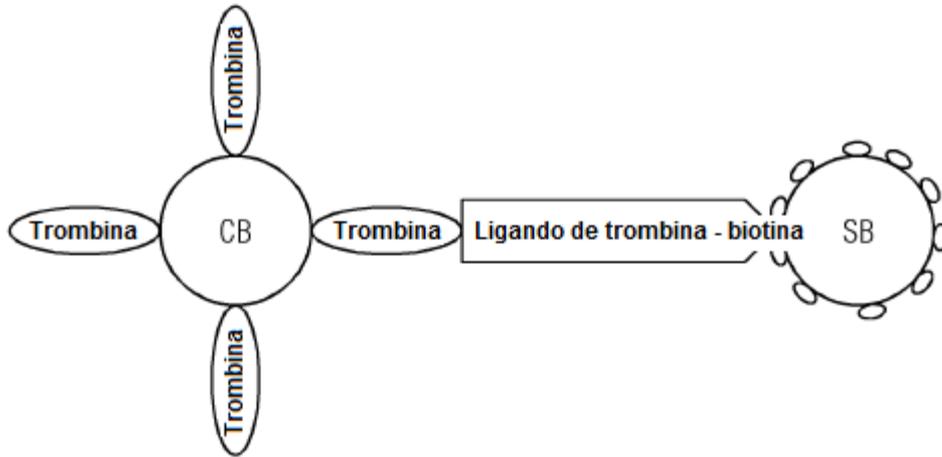


FIG 2

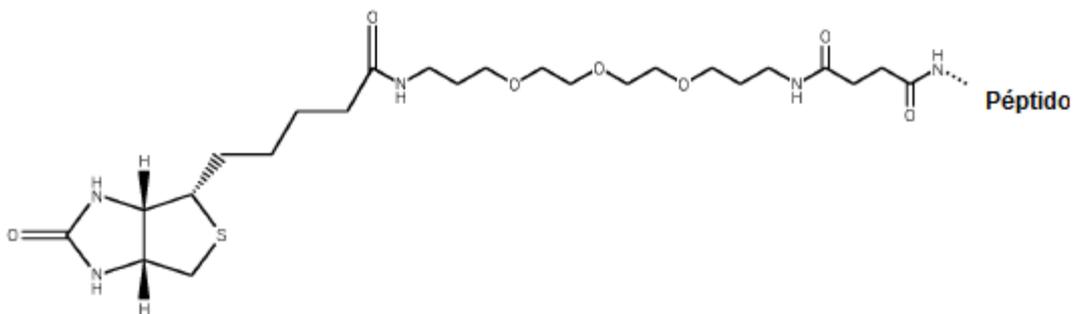


FIG 3

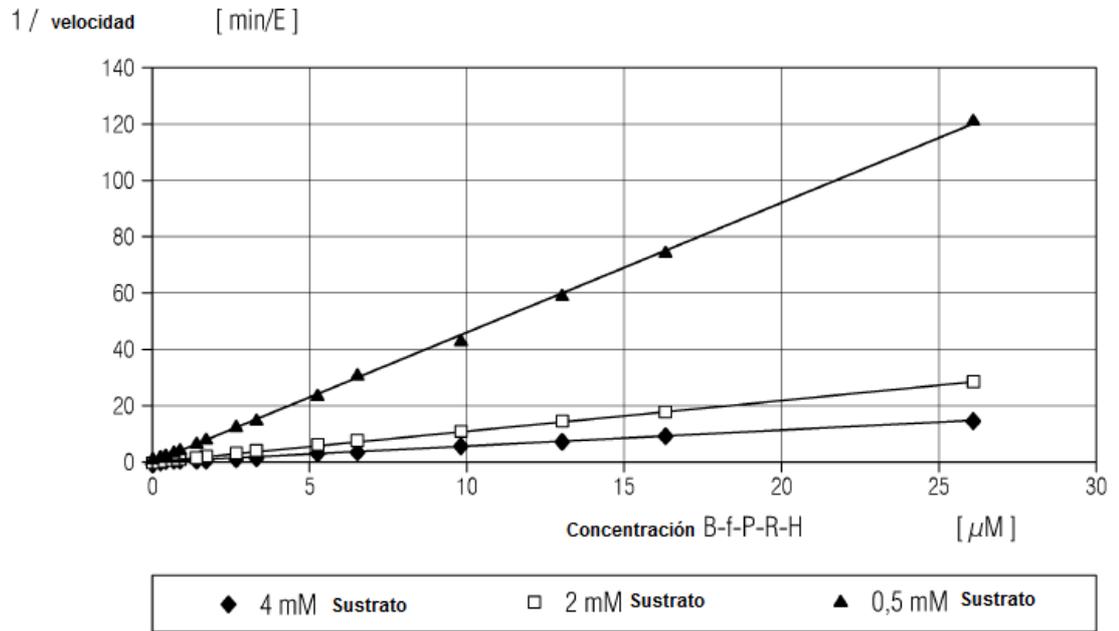


FIG 4

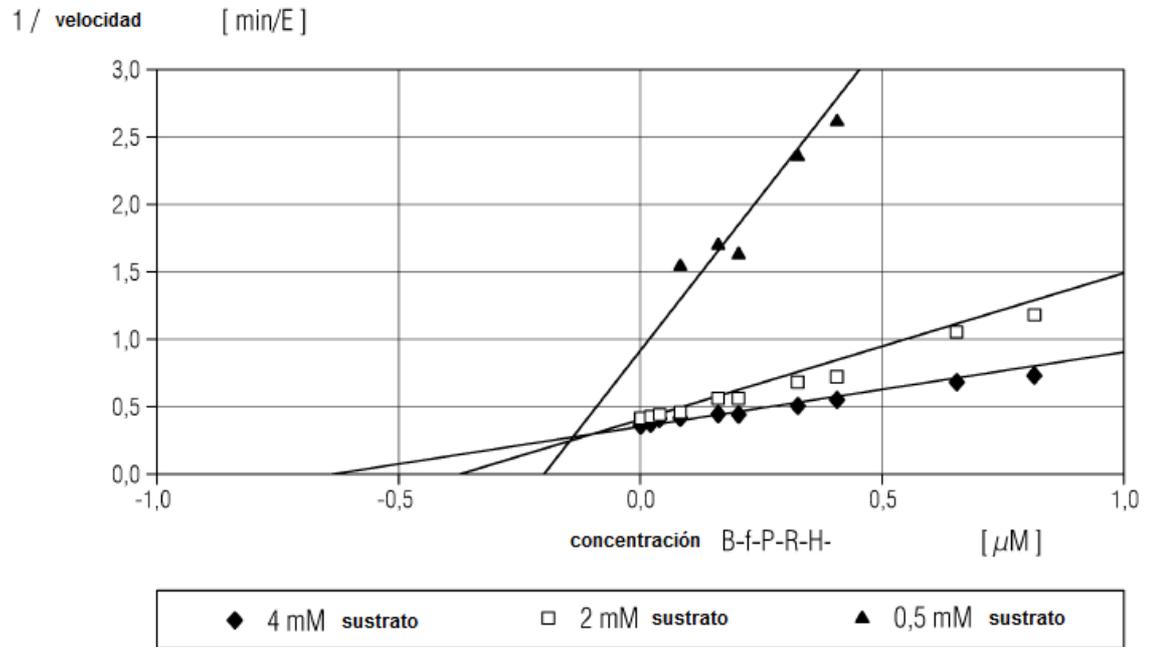


FIG 5

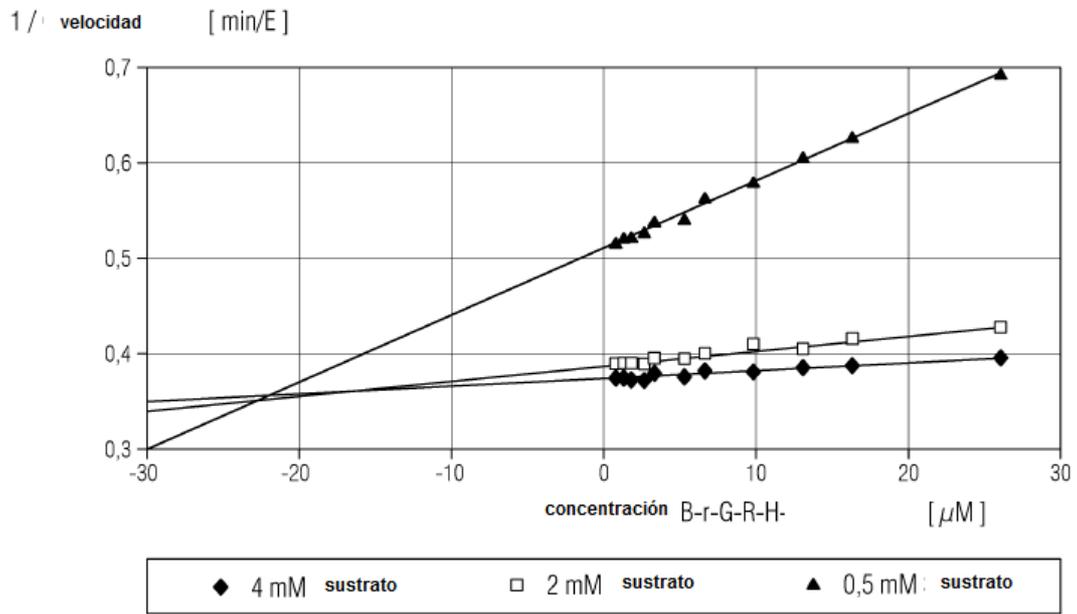


FIG 6

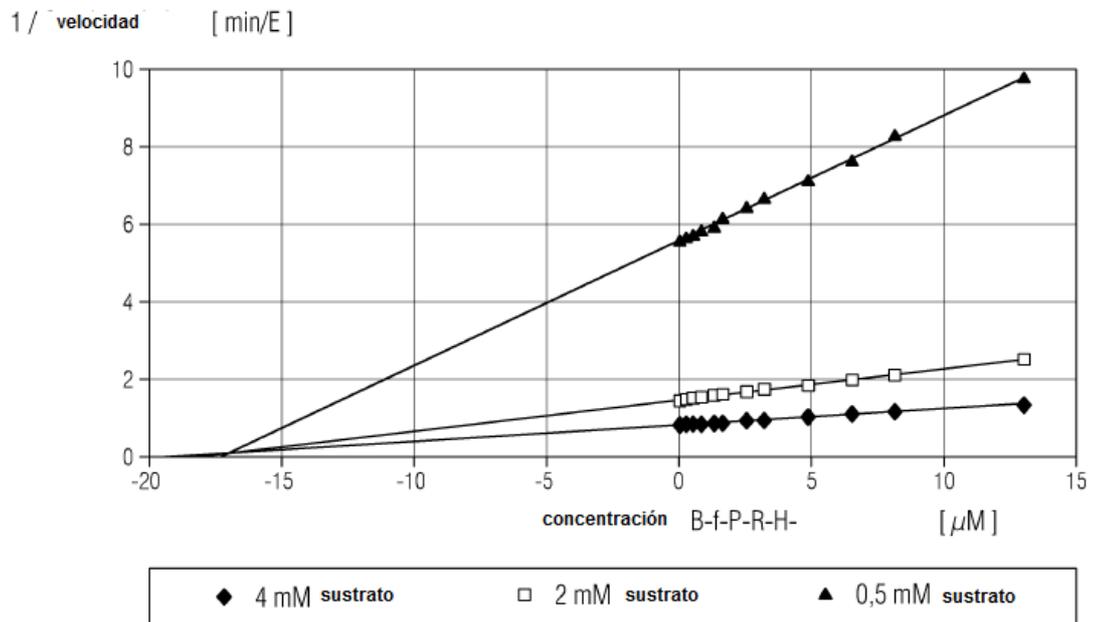


FIG 7

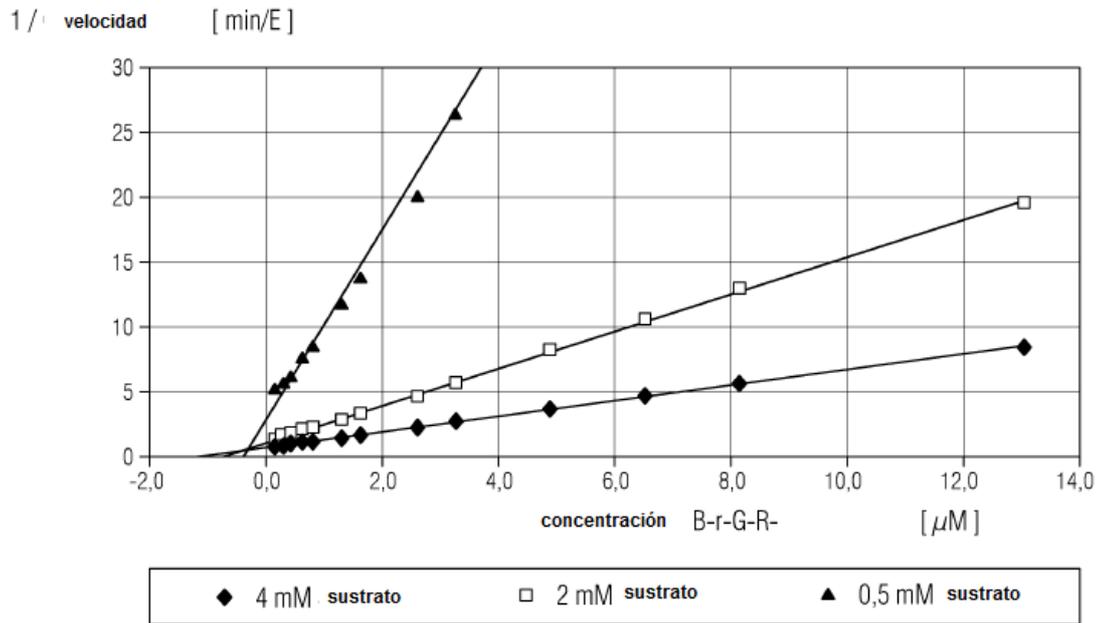


FIG 8

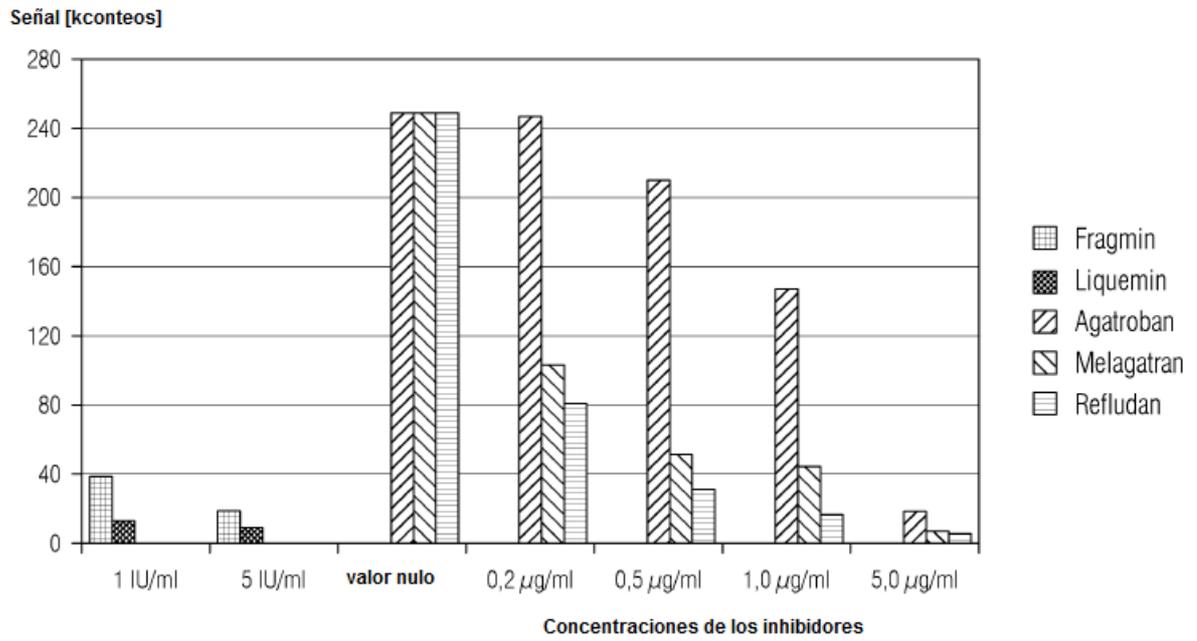


FIG 9

