

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 208**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2010 E 10711886 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2553470**

54 Título: **Composición para la determinación de las características de coagulación de un líquido de ensayo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2016

73 Titular/es:

**C A CASYSO AG (100.0%)
St. Jakobs-Strasse 17
4052 Basel, CH**

72 Inventor/es:

SCHUBERT, AXEL

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 586 208 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

Composición para la determinación de las características de coagulación de un líquido de ensayo

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de diagnóstico para su uso en el análisis viscoelástico de un líquido de ensayo, y a un recipiente que comprende el mismo. La presente invención además se refiere a un procedimiento de realización de un análisis viscoelástico en una muestra de sangre, y al uso de la composición de diagnóstico en dicho procedimiento.

Antecedentes

[0002] La coagulación de la sangre es un proceso complejo en el que la sangre forma coágulos sólidos. Es una parte importante de la hemostasia (la interrupción de la pérdida de sangre de un vaso dañado) por el que una pared del vaso sanguíneo dañado se cubre con un coágulo de sangre para detener la hemorragia y ayudar a la reparación del vaso dañado. Trastornos de la coagulación pueden producir un aumento de la hemorragia y/o trombosis y embolia.

[0003] En un individuo normal, la coagulación se inicia en menos de 20 segundos después de que se produzca una lesión en el vaso sanguíneo dañando las células endoteliales. Las plaquetas inmediatamente forman un tapón hemostático en el sitio de la lesión. Este proceso se denomina hemostasia primaria. La hemostasia secundaria sigue a continuación si los componentes del plasma denominados factores de coagulación responden en una cascada compleja para formar filamentos de fibrina que fortalecen el tapón plaquetario.

[0004] La cascada de la coagulación de la hemostasia secundaria tiene dos vías, la vía de activación por contacto (anteriormente conocida como vía intrínseca) y la vía del factor tisular (anteriormente conocida como vía extrínseca) que dan lugar a la formación de fibrina. Antes se pensaba que la cascada de la coagulación consistía en dos vías de igual importancia reunidas en una vía común. Ahora se sabe que la vía primaria para la iniciación de la coagulación de la sangre es la vía del factor tisular. Las vías son una serie de reacciones, en las que un zimógeno de una proteasa de serina y su co-factor glicoproteína se activan para convertirse en componentes activos que entonces catalizan la siguiente reacción en la cascada. Los factores de coagulación generalmente se indican por números romanos del I-XIII, con una minúscula "a" anexa para indicar la forma activada.

[0005] La fibrinólisis es el proceso en el que se descompone el coágulo de fibrina. El activador del plasminógeno tisular (tPA) y la uroquinasa son los agentes que convierten el plasminógeno en plasmina activa, lo que permite que se produzca la fibrinólisis.

[0006] La detección del funcionamiento normal o disminuido de estos componentes de la coagulación es importante a fin de evaluar los trastornos de la hemostasia de los pacientes.

[0007] Se conocen varios procedimientos de medición de las características de la coagulación de la sangre. Algunos de dichos dispositivos intentan simular el flujo natural de la sangre en las venas y arterias de un sujeto vivo, mientras que otras técnicas de medición se realizan en volúmenes de sangre estática.

[0008] Una medición precisa de la capacidad de la sangre de un paciente para coagular de manera oportuna y eficaz es crucial para ciertos procedimientos médicos y quirúrgicos. La detección rápida y precisa de coagulaciones anómalas también es de particular importancia con respecto al tratamiento adecuado a administrar a pacientes que padecen trastornos de la coagulación. A menudo, la dolencia de estos pacientes hace que sea necesario administrar componentes de la sangre, anti-coagulantes, ciertos agentes fibrinolíticos, agentes anti-plaquetarios, o compuestos que inducen los efectos inversos de dichos agentes. En estos casos, la dosis de tratamiento se puede adaptar al grado de un trastorno de la coagulación determinado previamente.

[0009] Las mediciones de la coagulación de la sangre son suministradas por varios dispositivos, por ejemplo como se describe en los documentos (Estados Unidos 5.777.215), (Estados Unidos 6.537.819), o (Estados Unidos 5.777.215). Estos dispositivos miden las propiedades mecánicas del coágulo durante todo su desarrollo estructural. Estos sistemas se resumen bajo el término "procedimientos viscoelásticos", ya que detectan continuamente propiedades viscoelásticas del coágulo de sangre durante su formación y lisis.

[0010] Una medición viscoelástica proporciona información acerca de varios parámetros diferentes, por ejemplo, el tiempo entre la activación de la coagulación y la iniciación del coágulo (tiempo de coagulación, CT), la dinámica de la formación de coágulos (tiempo de formación del coágulo, CFT), la firmeza del coágulo (amplitudes A5-A30 y máxima firmeza del coágulo, MCF), o el grado de fibrinólisis (lisis máxima, ML).

5

[0011] Una serie de referencias describen instrumentos para medir las características de coagulación de la sangre en base a movimientos mecánicos. Estos instrumentos controlan las propiedades elásticas de la sangre a medida que se induce su coagulación en un entorno de baja cizalladura, es decir, en volúmenes de sangre estática. Los patrones de cambio en la elasticidad de cizallamiento permiten la determinación de la cinética de formación del coágulo, así como la fuerza y la estabilidad del coágulo formado. La resistencia y la estabilidad del coágulo proporcionan información sobre la capacidad del coágulo para llevar a cabo el "trabajo de la hemostasia" (es decir, detener o prevenir la hemorragia anómala) y sobre la suficiencia de la interacción de las plaquetas y la fibrina en sangre. La cinética de formación de coágulos principalmente proporciona información acerca de la funcionalidad de los factores de coagulación. El análisis de toda esta información proporciona resultados que son útiles para predecir la hemorragia, para supervisar y gestionar la trombosis, o para controlar la fibrinólisis.

10

15

[0012] Sin embargo, puesto que el proceso de coagulación consta de varios componentes interrelacionados, posteriormente se aplica el uso de activadores e inhibidores específicos a fin de detectar más específicamente alteraciones de la hemostasia.

20

[0013] En consecuencia, los reactivos utilizados en el análisis viscoelástico constan de un activador inicial (por ejemplo, un activador de la vía intrínseca o de la vía extrínseca) y, opcionalmente, uno o más inhibidores (por ejemplo, inhibidores de la fibrinólisis, inhibidores de la heparina, inhibidores de plaquetas) y/o uno o más factores específicos adicionales de la cascada de la coagulación.

25

[0014] Opcionalmente se pueden añadir componentes adicionales:

- Calcio (CaCl₂): El calcio se añade para la recalcificación de la muestra. Se puede evitar que las muestras de sangre coagulen con varias sustancias anticoagulantes diferentes, como la heparina, el EDTA, y el citrato. Por lo general los ensayos funcionales se realizan con sangre anticoagulada con citrato. El citrato compleja el calcio de la muestra de sangre de forma moderada. El calcio es necesario para el proceso de coagulación, que está implicado en la formación del complejo y es un co-factor para la mayoría de los factores de coagulación (por ejemplo, FI, FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXIII, TF). Por lo tanto, la recalcificación de la muestra es necesaria para asegurar la correcta coagulación en la muestra, si la muestra se somete a citración durante la extracción de sangre (mediante el uso de un tubo de sangre que contiene citrato).

30

35

- Fosfolípidos: Varios complejos en la cascada de coagulación son dependientes de fosfolípidos y, por lo tanto, se podrían añadir fosfolípidos adicionales.

40

- Estabilizadores: Para la estabilización de los reactivos entre el momento de la producción y el análisis (por ejemplo, albúmina, gelatina)

[0015] Dependiendo de la finalidad del diagnóstico, estos reactivos se pueden utilizar solos o en combinación: por ejemplo, una medición únicamente con activador intrínseco en la muestra se puede combinar con una medición con activador intrínseco y una cantidad suficiente de inhibidor de la heparina (por ejemplo, heparinasa) en la muestra para detectar la presencia de heparina en el líquido de ensayo; se aplica una combinación de activador extrínseco e inhibidor de plaquetas (por ejemplo, citocalasina D) en la muestra para determinar la actividad de fibrinógeno sin la contribución de las plaquetas en el líquido de ensayo.

45

50

[0016] En la literatura existe un concepto de reactivo para mediciones viscoelásticas (TEG modificado con ReoPro: Wenker et al.: Thrombelastography, The Internet Journal of Anesthesiology, 2000, Volumen 1, Número 3; (<http://www.ispub.com/ostialindex.php?xmlFilePath=journals/ija/volln3/teg.xml>); Ruttmann et al.: Hemodilution Enhanced Coagulation Is Not Due to Platelet Clumping, Anesthesiology 2004; 101: A150; Recombiplastin- and ReoPro-modified TEG: http://www.transfusionguidelines.org.uk/docs/pdfs/bbt_app-use_teg-sop-example.pdf; TF- and Trasylol-modified TEG: Tanaka et al.: Evaluation of a novel kallikrein inhibitor on hemostatic activation in vitro, Thrombosis Research, Volumen 113, N.º 5, 2004, páginas 333-339) que se basa en la combinación de reactivos activadores disponibles en el mercado destinados a otros ensayos, tales como el activador del tiempo de protrombina Innovin o Recombiplastin®, combinados con una solución de CaCl₂ y fármacos a medida, tales como ReoPro® (abciximab) y Trasylol (aprotinina). Esto conduce a una baja normalización, muchas etapas de pipeteado y

55

muchas fuentes de error.

[0017] Hay un sistema de reactivos para mediciones viscoelásticas comercializado por Pentapharm, que se basa en reactivos normalizados, la mayoría de los cuales se ofrecen a los clientes en forma líquida, que el usuario 5 pipetea en la copa de ensayo utilizando procedimientos operativos normalizados. Esto normaliza su aplicación; sin embargo, todavía requiere varias etapas de pipeteado para su análisis. Por ejemplo, para realizar un ensayo de FIBTEM junto con un ensayo de control Extem, el pipeteado de la sangre, la solución de CaCl₂, el activador extrínseco y un inhibidor de plaquetas pueden dar lugar a la realización de un total de 8 etapas de pipeteado (incluyendo tres cambios de la punta durante un procedimiento de ensayo) y la necesidad de 3 reactivos diferentes 10 que deben ser manipulados por el usuario. Esto exige formación que consume tiempo y es una posible fuente de errores. Hay otros sistemas de reactivos en el mercado, que se basan en una variedad de reactivos. Algunos de ellos son líquidos y se deben pipetear en la copa (por ejemplo, solución de CaCl₂), algunos se secan en la copa de ensayo (tal como la heparinasa) y algunos se encuentran dentro de viales pequeños, en una cantidad destinada a un ensayo. Una característica de estos reactivos es que normalmente cada reactivo aún se proporciona solo, y por lo 15 tanto se requieren varias etapas al menos para ensayos que requieran más de un reactivo activo.

[0018] En consecuencia, en el pasado se han realizado algunos esfuerzos para proporcionar un sistema reactivo simple para mediciones viscoelásticas de la sangre o de sus componentes:

- 20 - su secado directamente en la copa que toma el volumen de la muestra durante la medición
- combinaciones líquidas estables de compuestos de los reactivos a la concentración de trabajo

[0019] Uno de los defectos de la estrategia de secado de reactivos activos directamente en la copa de 25 ensayo es que estas copas normalmente están fabricadas de plástico y son ligeras, lo que hace más difícil el llenado de estas copas en líneas automatizadas de dispensación de reactivos. Esto hace necesario etapas de llenado manuales o el desarrollo de equipos especializados, los cuales son caros. Otro inconveniente de esta estrategia es que los componentes activos o estabilizadores pueden interferir con la fuerza de adhesión del coágulo de sangre en las superficies de la copa, que es necesaria para llevar a cabo mediciones correctas. Por ejemplo, se ha demostrado 30 una menor adhesión del coágulo después de la incubación de una solución de albúmina en la copa (la albúmina es un estabilizador típico utilizado para estabilizar todo tipo de proteínas en reactivos):

	Control			Albúmina al 1 %		
	CT	MCF	ML	CT	MCF	ML
Muestra 1	139	62	0	136	41	66
Muestra 2	123	64	2	119	47	85
Muestra 3	121	65	0	130	42	79
Muestra 4	133	63	0	135	34	79
Media	129	63,5	0,5	130	41	77,25
SD	8,5	1,3	1,0	7,8	5,4	8,0

Tabla 1: Resultados de las mediciones de INTEM con y sin incubación previa con solución de albúmina.

35 **[0020]** Otra posible estrategia para simplificar la manipulación de los reactivos es combinar los diferentes reactivos necesarios para un ensayo en fase líquida a su concentración de trabajo. El principal problema en este caso es la interacción de las diferentes sustancias que permanecen juntas durante un período más prolongado. Algunos componentes afectan negativamente a la estabilidad de los otros cuando permanecen juntos en fase líquida 40 a concentraciones más altas; por ejemplo, el CaCl₂ altera la estabilidad del reactivo del factor tisular en fase líquida con el tiempo.

[0021] Por otra parte, si estos reactivos combinados se deben proporcionar en una cantidad suficiente exacta para un ensayo, surgiría otro problema: En este caso, la porción muy pequeña de reactivo líquido puede adherirse a 45 partes del recipiente del reactivo o a la tapa y por tanto no se mezclaría suficientemente con el líquido de ensayo cuando se realice el análisis.

[0022] Una estrategia propuesta para resolver los aspectos mencionados fue desvelada por Kolde et al., en la solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0071604. En esta solicitud, se presenta un sistema de copa para 50 análisis viscoelásticos, en el que el extremo inferior de la copa está dividido en varias cámaras de reactivos. Esto permite colocar los reactivos de forma independiente en las diferentes cámaras, sin mezclarlos y posteriormente

lioofilizar los reactivos.

[0023] Sin embargo, las desventajas de esta solución incluyen la necesidad de un proceso de pipeteado muy preciso, ya que las cámaras de reactivos independientes son muy pequeñas y además el problema de que las gotas de reactivos aún se pueden mezclar antes de la liofilización por las vibraciones presentes en la línea de llenado de reactivo. Otro problema es el posible secado al aire de las pequeñas gotas de reactivo durante el tratamiento en condiciones ambientales antes de que comience el proceso de liofilización. Una vez más, está presente el problema de manipular de forma automática el pequeño recipiente de plástico, y por tanto muy ligero, con líneas de llenado de reactivo convencionales.

10

[0024] Las mayoría de los procedimientos de ensayo de coagulación de uso rutinario en laboratorio sólo miden el tiempo desde la adición de un activador a la muestra hasta que se puede detectar la primera formación inicial de un coágulo de fibrina (= tiempo de coagulación). Se detienen en este punto y no se realiza ninguna medición más allá. Esto tiene las consecuencias de que en estos procedimientos no es necesaria una adhesión firme de la sangre a las superficies de la celda de medición. Por consiguiente, la variedad de analizadores y reactivos disponibles para la evaluación de los tiempos de coagulación con dichos procedimientos no tiene que gestionar los problemas específicos relacionados con las mediciones viscoelásticas.

[0025] El documento EP 0 972 203 describe un reactivo para la determinación de la aPTT, que comprende al menos una proteína de la coagulación, fosfolípidos y un activador de la coagulación intrínseca en forma de liofilizado. Sin embargo, en este caso surge el problema de que todos los componentes necesarios para realizar el análisis están en contacto inmediato entre sí. Por lo tanto, se pueden producir problemas de estabilidad o incompatibilidades a largo plazo al usar sustancias de esta forma.

[0026] El documento WO 2008/093216 describe una composición de diagnóstico para su uso en el análisis viscoelástico de un líquido de ensayo y un recipiente que comprende el mismo. La composición comprende al menos un activador de la coagulación, y, opcionalmente, CaCl_2 y uno o más inhibidores y/o componentes de la coagulación. La composición está presente como mezcla esencialmente seca de todos los componentes y en una cantidad suficiente para realizar un único análisis viscoelástico de una muestra de sangre o plasma especificado. Sin embargo, no se desvela que los constituyentes se incorporen cada uno en gránulos separados espacialmente.

Resumen de la invención

[0027] Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición de diagnóstico que permita un procedimiento seguro, reproducible y fácil de usar para diferentes ensayos en sistemas viscoelásticos. Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición de diagnóstico que esté adaptada específicamente para un único análisis de una muestra de sangre y que tenga una estabilidad de reactivos superior, con respecto a composiciones de la técnica anterior. Aún un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento de diagnóstico que proporcione resultados fiables y reproducibles, sea fácil de manipular y proporcione un sistema normalizado para la determinación de las características de coagulación de una muestra de sangre. Un objeto adicional de la invención es proporcionar una composición de diagnóstico del tipo anterior, que tenga una estabilidad mejorada a largo plazo.

[0028] Estos objetos se consiguen por el procedimiento de la reivindicación 1, la composición de la reivindicación 6, y el recipiente de la reivindicación 13.

[0029] Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.

[0030] Al usar la composición de diagnóstico de la invención, se pueden realizar los ensayos como sigue: Se añade un volumen definido de una muestra (por ejemplo, sangre entera, plasma sanguíneo etc.) directamente en un recipiente 1 que contiene la composición de diagnóstico. Después de disolver la composición en la muestra de sangre, la mezcla resultante se pipetea del recipiente 1 en la copa de medición 2 de un aparato de medición 4. A continuación, la copa 2 se pone en una posición tal que el alfiler 3 se sumerge en el líquido en la copa de ensayo (cp. Fig. 2).

55

[0031] Por lo tanto, el usuario sólo necesita 4 etapas de pipeteado para llevar a cabo cada ensayo (en el sistema líquido de la técnica anterior hay hasta 8 etapas, véase más arriba) y no es necesario un cambio de la punta de la pipeta.

[0032] Por lo tanto, es evidente que el presente sistema para la determinación de las características de coagulación de una muestra de sangre se puede manipular más fácilmente, con lo que la probabilidad de errores es más pequeña, que pueden ser debidos a una línea de acción imprecisa por un operario (potencialmente menos experimentado).

5

[0033] Según la invención, los componentes no están presentes en una mezcla de sustancias, sino que cada uno se incorpora en gránulos separados espacialmente. Esto permite una mejora de la estabilidad de la composición a largo plazo sin deterioro de sus otras características.

10 **[0034]** De ello pueden derivarse otras ventajas como, por ejemplo, una mayor reproducibilidad de los resultados a alcanzar y, por lo tanto, un mayor grado de normalización.

Breve descripción de los dibujos

15 **[0035]** Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de una descripción de las formas de realización con referencia a las figuras.

[0036] En las figuras:

20 La Figura 1 es un diagrama ejemplar que muestra una medición trombo-elastométrica típica;

La Figura 2 muestra un aparato de medición 4 para el análisis tromboelastométrico;

La Figura 3 es una ilustración de una copa de medición 2 de un aparato de medición 4 de la técnica anterior;

25

Las Figuras 4A, B, C son vistas esquemáticas en sección transversal de tres formas de realización preferidas de un recipiente 1 de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

30

[0037] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de diagnóstico para su uso en el análisis viscoelástico de un líquido de ensayo, que comprende:

a) al menos un activador de la coagulación; y

35 b) una sal de calcio, preferentemente CaCl_2 , en una cantidad suficiente para asegurar la recalcificación del líquido de ensayo; y,

c) un inhibidor de la heparina;

caracterizada porque

40

los componentes están presentes en una forma esencialmente seca y en una cantidad suficiente para llevar a cabo un único análisis viscoelástico de un líquido de ensayo especificado,

y en el que los componentes no están presentes en una mezcla de sustancias, sino que cada uno se incorpora en

45

gránulos separados espacialmente.

[0038] La sal de calcio preferentemente es CaCl_2 .

50 **[0039]** La composición de diagnóstico o mezcla de reacción de la presente invención comprende componentes que son conocidos de por sí en la técnica. Sin embargo, una diferencia de las estrategias de la técnica anterior es que la mezcla de estos constituyentes se proporciona en una forma esencialmente seca.

[0040] "Esencialmente" seca en el contexto de la invención significa un estado en el que la mezcla está esencialmente libre de cualquier líquido o humedad, en particular, que está empobrecida de agua. Sin embargo, puede haber presente agua o cualquier otro líquido, como residuo en la mezcla, pero sólo hasta cierto punto, que no influya negativamente en la estabilidad de la composición global. En particular, se debe descartar que se produzca una interacción entre los diferentes constituyentes, lo que afecta negativamente a la estabilidad. Debería ser aceptable una cantidad restante de líquido, preferentemente agua, en la composición de hasta el 10 % en peso.

[0041] La cantidad suficiente para llevar a cabo un único análisis viscoelástico de un líquido de ensayo especificado, por ejemplo, una muestra de sangre, es la cantidad de todos los componentes en la mezcla que proporciona la concentración requerida de los reactivos en el análisis final de las características de coagulación de la muestra de sangre, es decir, en la copa 2 de un aparato de medición 4. Por tanto, no es necesario repartir 5 adicionalmente la composición de diagnóstico antes o después de su disolución en un líquido.

[0042] Además, esto se consigue disolviendo las sustancias en el propio líquido de ensayo (muestra de sangre, etc.), no disolviendo los constituyentes en una cantidad de diluyente líquido que da lugar a la concentración de trabajo final.

10

[0043] Un elemento importante de la presente invención es que los componentes no están presentes en una mezcla de sustancias, sino en una forma separada espacialmente. Esto evita problemas relacionados con la estabilidad.

[0044] La separación espacial de los componentes se realiza incorporando cada componente en un material de soporte independiente. Este término significa que cada uno de los constituyentes se incorpora en entidades separadas en el espacio, tales como gránulos, mini-pastillas, etc. El término "material de soporte independiente" no significa necesariamente que los materiales utilizados sean químicamente diferentes. Sólo se quiere decir que están separados espacialmente unos de otros.

20

[0045] El soporte tiene forma de gránulos. Estos gránulos se pueden producir por procedimientos que son conocidos de por sí en la técnica anterior. Sin embargo, se prefiere usar uno de los dos procedimientos de producción de gránulos, que se describen brevemente a continuación:

25 a) El constituyente respectivo en solución se mezcla con un material de soporte adecuado, mezcla que se convierte entonces en forma de aerosol. Este aerosol, que contiene pequeñas gotas de la mezcla, se congela de golpe en nitrógeno líquido, a continuación se calienta en una atmósfera protectora y se almacena en un recipiente hermético (tal como un vial).

30 b) Los gránulos se producen como en a), sin embargo, la mezcla de partida no contiene ningún constituyente. El constituyente se proporciona como una solución y se deja caer sobre los gránulos en una atmósfera protectora. Después de secar sobre los gránulos, los gránulos se envasan en un recipiente hermético.

[0046] En una realización preferida, el material de soporte comprende al menos un hidrato de carbono, por ejemplo sacarosa, lactosa o celulosa. El material de soporte preferentemente no muestra una influencia significativa sobre el comportamiento de coagulación, el comportamiento de formación de coágulos, o el comportamiento de lisis de los coágulos.

35

[0047] El activador de la coagulación como se ha mencionado anteriormente preferentemente es un activador intrínseco y/o extrínseco.

40

[0048] El activador extrínseco de la coagulación a su vez preferentemente es el factor tisular (TF) y se selecciona más preferentemente entre TF lipidado o rTF.

[0049] El activador intrínseco de la coagulación se selecciona preferentemente entre celita, ácido elálgico, sulfatit, caolín, sílice, ARN, o sus mezclas.

45

[0050] Como segunda característica, la composición de diagnóstico de la presente invención comprende una sal de calcio, tal como CaCl_2 , en el que el CaCl_2 está presente preferentemente en una cantidad de aproximadamente 1-100 $\mu\text{mol/ml}$ de líquido de ensayo. Como se ha mencionado anteriormente, la cantidad de CaCl_2 debe ser suficiente para asegurar la recalcificación del líquido de ensayo, en particular, de la muestra de sangre, si la muestra se descalcifica antes. Resultó que la cantidad de 3-30 $\mu\text{mol/ml}$ es óptima para conseguir este requisito. Con el fin de determinar aún con más precisión la cantidad necesaria de CaCl_2 que debe estar contenida en la composición de diagnóstico, el volumen exacto de líquido de ensayo que se recoge del paciente debe ser conocido, así como la cantidad de reactivo de descalcificación empleado.

50

[0051] La composición de diagnóstico de la presente invención contiene un inhibidor de heparina.

[0052] Los inhibidores se pueden usar y combinar dependiendo de las demandas de diagnóstico precisas, por ejemplo, el inhibidor de plaquetas puede ser un inhibidor del citoesqueleto o un antagonista de GPIIb/IIIa.

Asimismo, el inhibidor de la fibrinólisis se puede seleccionar, por ejemplo, entre aprotinina, ácido tranexámico, o EACA; el inhibidor de la heparina se puede seleccionar, por ejemplo, entre heparinasa, protamina o péptidos relacionados con la protamina; y el factor de coagulación se puede seleccionar, por ejemplo, entre uno o más factores de coagulación o factores de coagulación activados, preferentemente entre FXa o FVa o la proteína C activada o FVIIIa. Sin embargo, se observa que esto sólo es una selección preferida y si es necesario se pueden utilizar más inhibidores.

5 **[0053]** En una realización preferida, la composición de diagnóstico también puede contener uno o más estabilizadores, en el que el estabilizador preferentemente es albúmina o gelatina.

10 **[0054]** En una realización preferida, la composición de diagnóstico también puede contener uno o más fosfolípidos, en el que los fosfolípidos pueden ser una composición de diferentes fosfolípidos, como fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidiletanolcolina. Por ejemplo, se pueden usar mezclas de fosfolípidos extraídos de cerebro de conejo.

15 **[0055]** La presente composición de diagnóstico puede tener la siguiente constitución en realizaciones preferidas:

- 20 • activación extrínseca insensible a la heparina: Combinación de activador extrínseco, inhibidor de la heparina y estabilizador y CaCl_2
- activación intrínseca insensible a la heparina: Combinación de activador intrínseco, inhibidor de la heparina y estabilizador y CaCl_2
- activación extrínseca sin activación de plaquetas, insensible a la heparina: Combinación de activador extrínseco, inhibidor de plaquetas, inhibidor de la heparina y estabilizador y CaCl_2
- 25 • activación intrínseca sin activación de las plaquetas, insensible a la heparina: Combinación de activador intrínseco, inhibidor de plaquetas, inhibidor de la heparina y estabilizador y CaCl_2
- activación extrínseca con inhibición de la fibrinólisis, insensible a la heparina: Combinación de activador extrínseco, inhibidor de la fibrinólisis, inhibidor de la heparina y estabilizador y CaCl_2
- activación intrínseca con inhibición de la fibrinólisis, insensible a la heparina: Combinación de activador intrínseco, inhibidor de la fibrinólisis, inhibidor de la heparina y estabilizador y CaCl_2
- 30 • activación extrínseca con factor de coagulación adicional, insensible a la heparina: Combinación de activador extrínseco, uno de los factores de coagulación adicional, inhibidor de la heparina y estabilizador y CaCl_2
- activación intrínseca con factor de coagulación adicional, insensible a la heparina: Combinación de activador intrínseco, uno de los factores de coagulación adicional, inhibidor de la heparina y estabilizador y CaCl_2

35 **[0056]** En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un recipiente 1, que comprende la composición de diagnóstico como se define anteriormente. El recipiente 1 tiene preferentemente la forma de un vial o una cubeta.

40 **[0057]** El recipiente 1 está formado de un material (por ejemplo, plástico o vidrio), que no se corroe o se ve afectado de otro modo por los reactivos con los que se ha de rellenar o por el líquido de ensayo con el que se ha de rellenar.

45 **[0058]** El recipiente 1 puede tener forma cilíndrica, pero su forma no tiene que ser necesariamente cilíndrica. El recipiente 1 puede tener una forma que reduce su perfil lateral interior desde la apertura superior a la parte inferior, como por ejemplo forma cónica como se indica en la Fig. 4 o al menos una forma parcialmente cónica. Esto proporciona un mejor manejo de las, por lo general, pequeñas cantidades de mezcla de reactivo líquido. Utilizando viales de fondo plano con un diámetro más pequeño se reduciría este problema, pero entonces dichos viales podrían tener un diámetro de apertura que es demasiado estrecho para ser manipulado con el equipo de pipeteo convencional utilizado junto con los dispositivos de diagnóstico como, por ejemplo, el trombo-elastómetro ROTEM. (En cuanto al diseño del sistema ROTEM y la forma de utilizarlo, se hace referencia a la publicación de Estados Unidos 5.777.215).

55 **[0059]** Por otra parte, este tipo de viales pequeños podrían llegar a ser más difíciles de manipular para los sistemas de tratamiento automatizado comunes y por lo tanto podrían aumentar los costes de producción.

[0060] La sección transversal de un recipiente 1 básicamente simétrico a su eje de una realización preferida se muestra en la Fig. 4A. Sin embargo, hay que señalar expresamente que la presente invención no se limita al

mismo, y también se pueden usar en forma de U, con forma rectangular o formas similares.

[0061] Como se ha mencionado anteriormente, el recipiente 1 se puede cerrar o sellar con una tapa 5 o similar con el fin de evitar una pérdida de los reactivos, o una invasión de contaminantes, agua, etc.

5

[0062] En una realización adicional, el recipiente 1 está diseñado de manera que se pueda utilizar directamente como copa de medición 2 del aparato de medición viscoelástica 4. En otras palabras, se puede realizar un análisis viscoelástico de tal manera que se proporcione el respectivo recipiente 1, el líquido de ensayo se añade en el recipiente 1, y la medición se lleva a cabo directamente en el recipiente 1. En este caso, sólo se tiene que realizar la dispensación de la sangre en el recipiente como etapa de transferencia de líquido, que se puede realizar mediante el uso de una pipeta manual, una pipeta automática, un dispensador automático o cualquier otro equipo de transferencia de líquido.

10

[0063] En esta realización, el recipiente 1 puede estar diseñado por combinación de dos materiales, por ejemplo, vidrio y plástico o vidrio y un revestimiento superficial. En este contexto, la parte del recipiente fabricada de vidrio no tiene que cubrir necesariamente toda parte inferior de la zona de plástico, sino que podría estar construida de acuerdo con la Figura 4C.

15

[0064] En las Figuras 4B y C, se puede ver una realización adicional de la invención. El recipiente 1 (por ejemplo, una cubeta) se puede incorporar a una estructura más grande, por ejemplo un artículo de vidrio, que proporciona algunas ventajas técnicas: esta configuración puede proporcionar una sujeción para el contenedor.

20

[0065] En estas realizaciones se descarta la posible activación de la coagulación en el líquido de ensayo por la superficie de vidrio, mientras que se siguen utilizando las propiedades superiores de sellado del material de vidrio cuando se compara con material plástico. Se puede conseguir el efecto similar de suprimir la posible activación de la coagulación en el líquido de ensayo por la superficie del vidrio, cubriendo la superficie de vidrio (o al menos la parte interior de la superficie de vidrio) con una capa de una o más sustancias que no son capaces de activar la coagulación si están en contacto con la sangre o con los componentes sanguíneos.

25

[0066] Para su comparación, en la Fig. 3 se ilustra una copa de medición 2 de la técnica anterior de acuerdo con el documento de Estados Unidos 2004/0071604:

30

[0067] Se proporciona un recipiente 1, que sirve como soporte del reactivo y recipiente de medición (es decir, se puede considerar como una copa de medición 2) para el análisis utilizando diversos procesos de análisis, y tiene una región que se divide en al menos dos cámaras (6a, 6b, 6c) con una o más barras que se extienden desde la pared del recipiente o la base del recipiente, en el que las cámaras están dispuestas de manera que los reactivos líquidos o sólidos se puedan introducir en la misma sin que se puedan mezclar por difusión o toparse entre sí. El recipiente 1 se utiliza para el secado o la liofilización con cámaras completa o parcialmente llenas y al mismo tiempo sirve como recipiente de medición después de volver a disolver el material seco mediante la adición de agua, la solución de reactivo, o la muestra presente en la fase acuosa.

35

40

[0068] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de realización de un análisis viscoelástico en una muestra de sangre que comprende las etapas de:

- 45 a) proporcionar una muestra de sangre;
- b) proporcionar un recipiente 1 tal como se define anteriormente;
- c) añadir la muestra de sangre a dicho recipiente 1, disolviendo de ese modo la composición de diagnóstico que contiene;
- d) poner el recipiente 1 en un aparato 4 adecuado para realizar un análisis viscoelástico; y
- 50 e) realizar el análisis viscoelástico de dicha mezcla.

45

50

[0069] Como ya se ha mencionado anteriormente, el líquido de ensayo es una muestra de sangre, preferentemente es una muestra de sangre de mamífero, más preferentemente una muestra de sangre o de componentes sanguíneos humanos (por ejemplo, sangre entera o plasma sanguíneo).

55

[0070] La etapa c) del procedimiento de la presente invención preferentemente requiere aproximadamente 1-60 s, más preferentemente 2-10 segundos y lo más preferentemente requiere aproximadamente 5 segundos. Después de ese tiempo, la mezcla de la composición de diagnóstico y la muestra de sangre se deben transferir rápidamente a la copa de medición 2 del aparato de medición 4. Esto se hace en la etapa d) mediante pipeteo

manual o automático de la mezcla desde el recipiente 1 y mediante su transferencia de este modo al aparato 4, es decir, a la copa de medición 2 del aparato 4.

[0071] El aparato 4 preferentemente es un dispositivo adecuado para las mediciones viscoelásticas, por ejemplo, dispositivos desvelados en los documentos (Estados Unidos 5.777.215), (Estados Unidos 6.537.819), o (Estados Unidos 5.777.215).

[0072] Un ejemplo de dicho aparato 4 se muestra en la Fig. 2:

10 **[0073]** Después de la formación del coágulo entre la copa 2 (cubeta) y el alfiler 3, el propio coágulo se estira por el movimiento del alfiler 3 con respecto a la copa 2. La detección de los parámetros característicos del coágulo se basa en el acoplamiento mecánico de copa 2 y el alfiler 3 por el coágulo. Esto sólo es posible si el coágulo se adhiere a las superficies tanto de la copa 2 como del alfiler 3. Por lo tanto, para el análisis viscoelástico esencialmente se requiere una adhesión firme sobre las superficies tanto de la copa 2 como del alfiler 3.

15

[0074] El procedimiento de la presente invención comprende un análisis viscoelástico de este tipo de una muestra de sangre con el fin de determinar sus características de coagulación, en el que un análisis viscoelástico de este tipo en el sentido más amplio es la medición de un movimiento relativo de una cubeta que contiene una muestra de sangre en relación con un punzón. El análisis preferentemente comprende la determinación del tiempo de coagulación, el tiempo de formación del coágulo, y la firmeza del coágulo con el tiempo que incluye efectos fibrinolíticos.

20

[0075] En la práctica, se pueden realizar las etapas siguientes:

25 1. Se añade un volumen definido de una muestra (por ejemplo, sangre entera, plasma) directamente en un vial que contiene la composición de reactivo; la medición debe comenzar en un momento cercano al momento de la adición de la muestra

2. Después de disolver la mezcla de reactivo en la muestra (5 segundos) la mezcla de reactivo-muestra se pipetea del vial de reactivo a la copa de medición 2 (no es necesario si el propio vial actúa como copa de medición 2)

30 3. La copa 2 se pone entonces en una posición tal que el alfiler 3 se sumerja en el líquido contenido en la copa de ensayo, la medición continúa hasta que se detiene por el usuario

[0076] Por lo tanto, el usuario no necesita realizar más de 4 etapas de pipeteado en total para cada ensayo (en comparación con las hasta 8 etapas necesarias para un sistema de reactivo líquido) y no es necesario ningún cambio de la punta de la pipeta en la preparación de un ensayo. Esto indica claramente el beneficio directo de la presente invención para la persona que vaya a realizar este tipo de ensayos.

35

[0077] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una composición de diagnóstico o de un recipiente 1 como se define anteriormente en un procedimiento para analizar el comportamiento viscoelástico de una muestra de sangre.

40

[0078] Aunque la presente invención ha sido descrita de acuerdo con realizaciones preferidas, es evidente para un experto en la materia que son posibles modificaciones en todas las realizaciones.

45 Símbolos de referencia

[0079]

- | | |
|-----------|----------------------|
| 1 | recipiente |
| 2 | copa de medición |
| 50 3 | alfiler |
| 4 | aparato de medición |
| 5 | tapa |
| 6 a, b, c | cámaras de reactivos |

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para realizar un análisis viscoelástico en una muestra de sangre, que comprende las etapas de:
- 5
- a) proporcionar una muestra de sangre;
 - b) proporcionar un recipiente (1) que contiene una composición de diagnóstico que comprende al menos un activador de la coagulación; una sal de calcio, preferentemente CaCl_2 , en una cantidad suficiente para asegurar la recalcificación de la muestra de sangre; y un inhibidor de la heparina; en el que los componentes están presentes en una forma esencialmente seca y en una cantidad suficiente para realizar un único análisis viscoelástico de una muestra de sangre especificada, y en el que los componentes no están presentes en una mezcla de sustancias, sino que cada uno se incorpora en gránulos separados espacialmente;
 - 10 c) añadir la muestra de sangre a dicho recipiente (1), disolviendo de ese modo la composición de diagnóstico que contiene;
 - 15 d) poner el recipiente (1) en un aparato (4) adecuado para realizar un análisis viscoelástico; y
 - e) realizar el análisis viscoelástico de dicha mezcla.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre es una muestra de sangre de un mamífero, más preferentemente una muestra de sangre humana.
- 20
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la etapa c) requiere aproximadamente 1-60 segundos, preferentemente unos 2-10 segundos, más preferentemente unos 5 segundos.
4. El procedimiento de una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el aparato (4) es un tromboelastómetro o una tromboelastógrafo.
- 25
5. El procedimiento de una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el análisis comprende la determinación del tiempo de coagulación, el tiempo de formación del coágulo, la firmeza del coágulo con el tiempo y/o la fibrinólisis.
- 30
6. Una composición de diagnóstico para su uso en el procedimiento de una o más de las reivindicaciones 1-5 para el análisis viscoelástico de una muestra de sangre, que comprende:
- a) al menos un activador de la coagulación;
 - 35 b) una sal de calcio, preferentemente CaCl_2 , en una cantidad suficiente para asegurar la recalcificación de la muestra de sangre; y
 - c) un inhibidor de la heparina;
- caracterizada porque**
- 40
- los componentes están presentes en una forma esencialmente seca y en una cantidad suficiente para realizar un único análisis viscoelástico de una muestra de sangre especificada, y en el que los componentes no están presentes en una mezcla de sustancias, sino que cada uno se incorpora en gránulos separados espacialmente.
- 45
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la separación espacial de los componentes se realiza mediante la incorporación de cada componente a un material de soporte independiente, en el que el material de soporte comprende preferentemente al menos un hidrato de carbono, más preferentemente sacarosa, lactosa o celulosa.
- 50
8. La composición de diagnóstico de la reivindicación 6, en la que el activador de la coagulación es un activador intrínseco y/o extrínseco.
9. La composición de diagnóstico de la reivindicación 8, en la que el activador extrínseco de la coagulación es el factor tisular (TF), preferentemente TF lipidado o TF recombinante (rTF), o
- 55 en la que el activador intrínseco de la coagulación se selecciona del grupo que consiste en celita, ácido elágico, sulfatit, caolín, sílice, ARN, o sus mezclas.
10. La composición de diagnóstico de la reivindicación 6, en la que el inhibidor de la heparina se selecciona entre heparinasa, protamina o péptidos relacionados con la protamina.

11. La composición de diagnóstico de una o más de las reivindicaciones 6-10, en la que el factor de coagulación se selecciona entre uno o más factores de coagulación o factores de coagulación activados, preferentemente FXa o FVa o proteína C activada o FVIIa, y/o
5 en la que el CaCl₂ está presente en una cantidad de aproximadamente 1-100 μmol/ml de la muestra de sangre.
12. La composición de diagnóstico de una o más de las reivindicaciones 7-12, en la que la forma seca es una forma liofilizada, y/o que comprende además un estabilizador, preferentemente albúmina o gelatina.
- 10 13. Un recipiente, que comprende la composición de diagnóstico de una o más de las reivindicaciones 6-12,
en el que el recipiente (1) preferentemente adopta la forma de un vial o una cubeta, más preferentemente se conforma de manera que el perfil lateral interior se reduce desde la apertura hacia la parte inferior.
- 15 14. El recipiente de la reivindicación 13 con su parte interna conformada de manera que se puede conectar a un dispositivo para realizar mediciones viscoelásticas

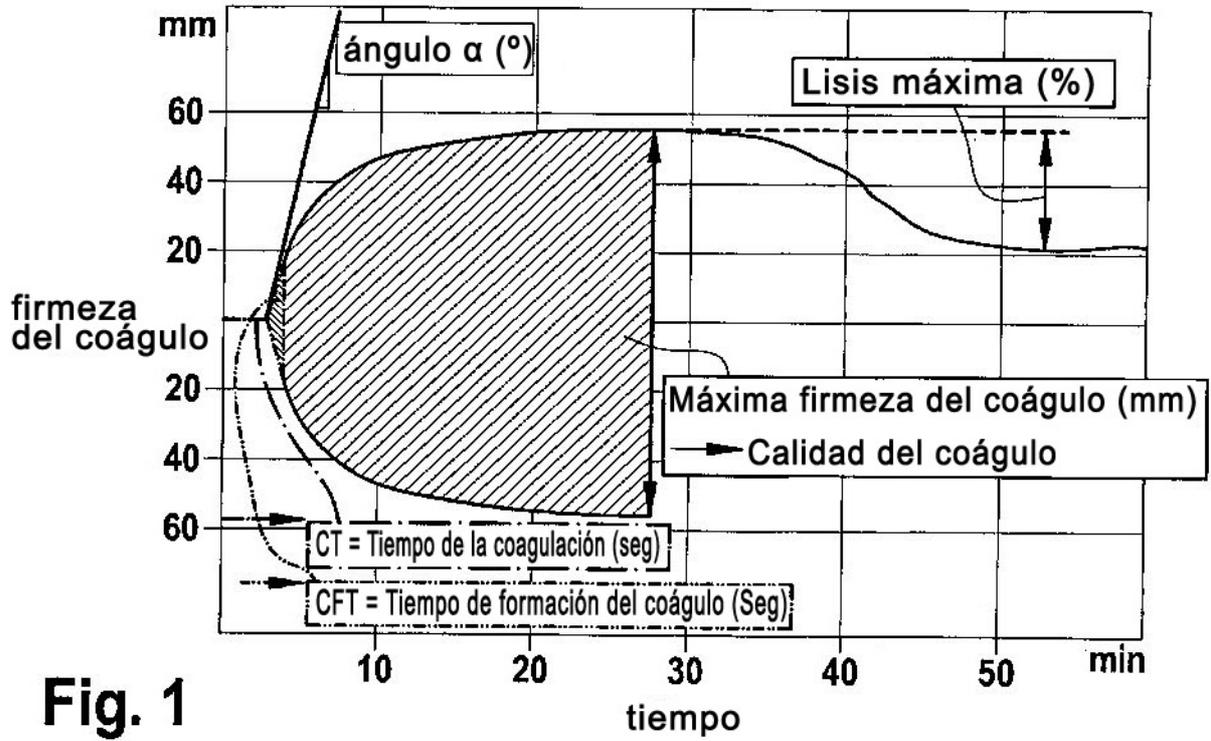


Fig. 1

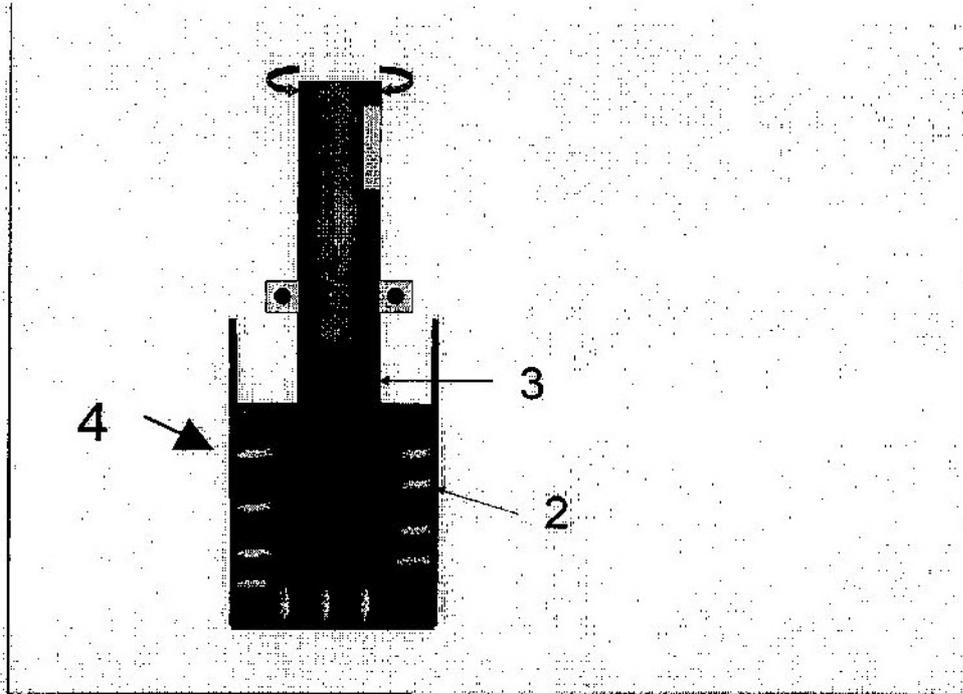


Fig. 2

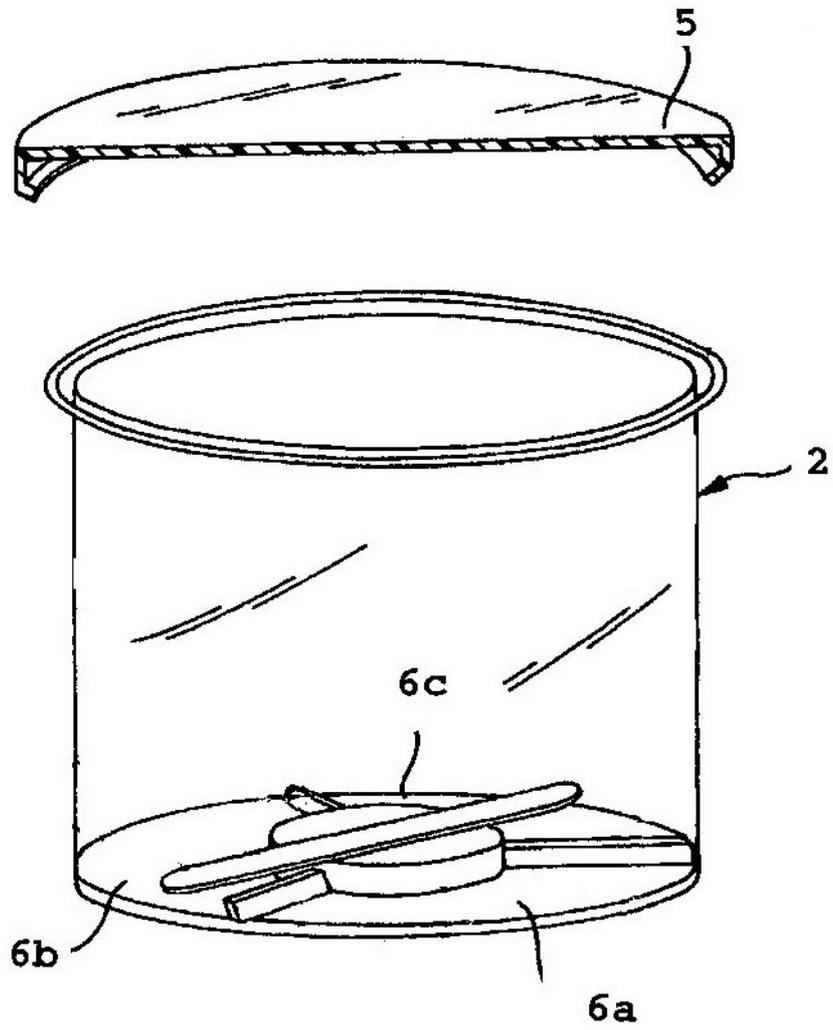


Fig. 3

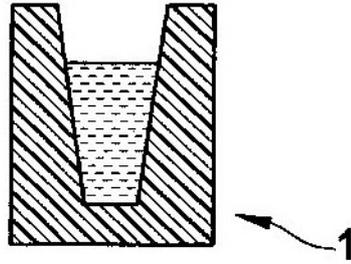


Fig. 4A

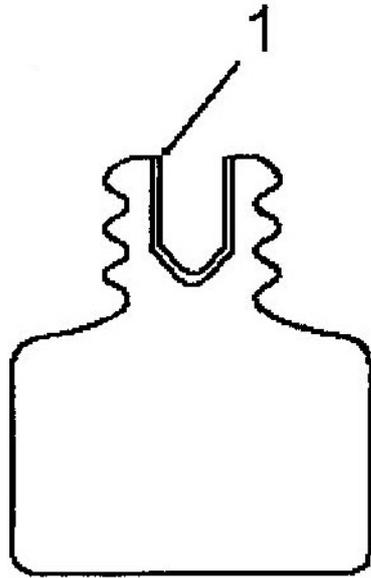


Fig. 4B

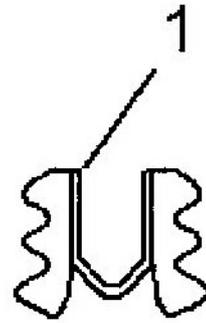


Fig. 4C