

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 723**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012 PCT/JP2012/065434**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO2012173260**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12801236 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2722675**

54 Título: **Método de medición del tiempo de coagulación sanguínea para detectar anticoagulantes de Lupus**

30 Prioridad:

17.06.2011 JP 2011135174

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2017

73 Titular/es:

**SCHOOL JURIDICAL PERSON HIGASHI-NIPPON-
GAKUEN (50.0%)
1757, Aza Kanazawa Tobetsu-cho, Ishikari-gun
Hokkaido0610293, JP y
SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**IEKO, MASAHIRO;
MORIKAWA, CHIZURU y
HATTORI, KEIKO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 613 723 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 de medición del tiempo de coagulación sanguínea para detectar anticoagulantes de Lupus

5 **Campo Técnico**

La presente invención se refiere a un método para medir el tiempo de coagulación sanguínea de una muestra de sangre que se va a ensayar con el fin de detectar un anticoagulante de lupus.

10 **Técnica antecedente**

La medición del tiempo de coagulación sanguínea se lleva a cabo para explorar la presencia o ausencia de cualquier anomalía en el sistema de coagulación de la sangre, o para medir la actividad de los factores de coagulación sanguínea individuales, midiendo el periodo de tiempo que comienza desde el punto de tiempo en el que se añade un reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea incluyendo un agente activador de los factores de coagulación sanguínea (al que se hace referencia de aquí en adelante simplemente como agente activador) y/o Ca^{2+} y similares a un espécimen de sangre o una mezcla de especímenes de sangre, hasta el punto de tiempo en el que se forman coágulos de fibrina detectables (tiempo de coagulación sanguínea; al que también se puede hacer referencia de aquí en adelante simplemente como tiempo de coagulación). También, se puede hacer referencia también a la formación de coágulos de fibrina simplemente como coagulación). Ejemplos típicos de ensayos de coagulación sanguínea incluyen el tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), y tiempo de trombina. De aquí en adelante, en la presente memoria descriptiva, se puede hacer referencia a los factores de coagulación sanguínea simplemente como factores de coagulación.

El PT es el tiempo que se toma desde la adición de una mezcla líquida de tromboplastina tisular y Ca^{2+} a un plasma de ensayo, para que se produzca la coagulación, y pretende examinar de manera detallada la actividad de coagulación del factor VII, factor X, factor V, protrombina, fibrinógeno y similares que se asocian con la ruta extrínseca de coagulación. Además, APTT es el tiempo que se toma desde la adición de una cantidad suficiente de fosfolípidos y un agente activador (caolín, ácido silícico anhidro, ácido elálgico, o similares) y una cantidad apropiada de Ca^{2+} a un plasma de ensayo, para que se produzca la coagulación, y esto pretende examinar de manera detallada la actividad de coagulación del factor XII, factor XI, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular, factor IX, factor VIII, factor X, factor V, protrombina, fibrinógeno y similares, que se asocian con la ruta intrínseca de la coagulación. En general, al hacer referencia a una anomalía en estos ensayos de coagulación sanguínea se refiere a la prolongación del tiempo de coagulación. La anomalía en los sistemas de coagulación sanguínea refleja los signos o resultados de la tendencia a hemorragia o la tendencia a trombosis (tendencia a la coagulación sanguínea) en el cuerpo.

Con respecto a las causas para la prolongación del tiempo de coagulación, se puede considerar lo siguiente: 1) deficiencia o disminución de los factores de coagulación sanguínea, 2) la presencia de un anticuerpo contra un componente de la sangre que constituye el sistema de coagulación sanguínea, 3) la presencia de un anticuerpo contra un componente del reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea, 4) la presencia de un anticuerpo contra un complejo de un componente sanguíneo que constituye el sistema de coagulación sanguínea y un componente en el reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea, y 5) la administración de un fármaco que inhibe la reacción de coagulación sanguínea.

Sin embargo, llevando a cabo simplemente la medición del tiempo de coagulación sanguínea no es posible discriminar si la causa de la prolongación del tiempo de coagulación es, por ejemplo, una disminución en la actividad de coagulación sanguínea debido a una simple deficiencia de los factores de coagulación, o una disminución en la actividad de la coagulación sanguínea debido a la inhibición de la reacción de coagulación por un anticuerpo (inhibidor) contra un componente que constituye el sistema de coagulación sanguínea o un componente del reactivo de medición del tiempo de coagulación sanguínea. Por otra parte, como el protocolo terapéutico varía con la diferencia en la causa relevante de la prolongación, la discriminación de la causa de la prolongación es importante. Por lo tanto, existe un ensayo de corrección de la coagulación sanguínea (al que también se puede hacer referencia de aquí en adelante como "ensayo de combinación" o "ensayo de mezcla") en el que con el fin de determinar la causa de prolongación, se añade plasma normal al plasma de ensayo y se representa en un gráfico hasta qué punto se corrige (se normaliza) el tiempo de coagulación sanguínea del plasma de ensayo para determinar la causa (Documento No Patente 1; Documento de Patente US 4877741).

Convencionalmente, el ensayo de mezcla se lleva a cabo, por ejemplo, de la manera que se describe a continuación.

Se preparan las muestras añadiendo y mezclando plasma normal a un plasma de ensayo de manera que las proporciones del plasma normal sean de un 0%, 20%, 50%, 80% y 100% y se mide el APTT. Los resultados se representan en un gráfico (eje horizontal: proporción de plasma normal incorporado o la proporción (%) del plasma de ensayo, eje vertical: tiempo de coagulación (segundos)), y la causa de la prolongación el tiempo de coagulación se discrimina visualmente y se determina a partir de la forma del gráfico. Por ejemplo, cuando el plasma de ensayo

es deficiente en factores de coagulación, la adición de una pequeña cantidad de plasma normal (20% en la FIG. 1(A)), acorta significativamente el tiempo de coagulación de manera que el tiempo de coagulación se aproxima mucho al valor obtenido cuando se mide un 100% de plasma normal. Por lo tanto, el gráfico muestra una curva convexa descendente por debajo de una línea recta (línea discontinua) que conecta los puntos correspondientes al 100% de plasma de ensayo y al 100% de plasma normal (FIG. 1(A)).

Cuando está presente un factor inhibidor de la coagulación en el plasma de ensayo, el factor inhibidor de la coagulación relevante inactiva los factores de coagulación en el plasma normal que se añade, incluso cuando se aumenta la proporción de adición de plasma normal. Por lo tanto, el alcance de la mejoría en el tiempo de coagulación debido a la adición de plasma normal es escaso, y se muestra una curva que es convexa descendente (FIG. 1(B)).

Un factor inhibidor de la coagulación que afecta la sensibilidad del reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea, se conoce como anticoagulante de lupus (de aquí en adelante, LA). El LA se define como una inmunoglobulina que inhibe una reacción de coagulación dependiente de fosfolípidos in vitro, sin inhibir la actividad de los factores de coagulación individuales, y no es un anticuerpo sencillo. Aunque la presencia de fosfolípidos es esencial para la reacción de coagulación, habitualmente, muchos de los reactivos para la medición del tiempo de coagulación sanguínea son ricos en fosfolípidos. El LA reacciona con los fosfolípidos de los reactivos, consumiendo de esta manera estos fosfolípidos, y en consecuencia inhibe la reacción de coagulación prolongando el tiempo de coagulación. Por lo tanto, los resultados de los ensayos de coagulación tales como PT y APTT a menudo son anormales. Sin embargo, como el LA varía en la intensidad de reacción dependiendo del tipo de fosfolípido (origen, composición de fosfolípido, y similares), se sabe que se obtienen diferentes resultados de determinación de positividad/negatividad de LA dependiendo del reactivo de medición del tiempo de coagulación sanguínea que se utilice.

Documentos de la técnica relacionada

Documentos No Patentes

Documento No Patente 1: Kensa to Gijutsu (Examination and Technology), Vol. 34, no. 8, Agosto 2006, p. 735-742

Documento No Patente 2: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 7: pp. 1737-1740, 2009

Divulgación de la invención

Problema a resolver por la invención

Con respecto a la terapia anticoagulante, la heparina que tiene una eficacia inmediata y se puede administrar por vía intravenosa se utiliza en el momento de una emergencia, y se utiliza la warfarina que es un anticoagulante oral para la prevención basada en una administración a largo plazo. Entre estas, se sabe que la warfarina suprime la biosíntesis en el hígado del Factor II (protrombina), Factor VII, Factor IX y Factor X entre los factores de coagulación sanguínea antagonizando la acción de la vitamina K in vivo. Por lo tanto, en los casos de los consumidores de warfarina, las personas que tienen una deficiencia de vitamina K, o pacientes con un fallo hepático (pacientes que padecen cirrosis hepática, hepatitis fulminante o hepatitis crónica, y similares), cuando se utilizan los métodos convencionales para identificar la causa de la prolongación del tiempo de coagulación sanguínea por el ensayo de mezcla, no se identifica claramente si la prolongación es una prolongación del tiempo de coagulación basada en un anticuerpo anti-fosfolípidos tal como el LA, o una prolongación del tiempo de coagulación basada en la acción de la warfarina, deficiencia de vitamina K, o deficiencia en factores de coagulación sanguínea basada en un fallo hepático, y ha sido difícil la discriminación de la causa. Este problema se vuelve más serio en el caso de pacientes que reciben la administración de warfarina y son positivos a LA. Esto es debido a que cuando se determina o se sospecha una positividad a LA, y se inicia una terapia anticoagulante, la detección de LA, y el control y seguimiento del aumento y disminución de LA son importantes, pero no se pueden llevar a cabo con precisión.

La Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) ha recomendado que en el momento de la detección de LA, se debe hacer la medición después de mezclar el plasma de ensayo con una cantidad igual de plasma de una persona sana con el fin de suplementar cualquier insuficiencia de los factores de coagulación. Aquí, con respecto a los plasmas de personas sanas que se utilizan aquí, se preparan en el laboratorio y se utilizan plasmas que se han sometido a una doble centrifugación de manera que el número de plaquetas sanguíneas sea menor de $10^7/\text{ml}$, y se tienen que acondicionar de manera que la actividad de todos los factores de coagulación sanguínea sea del 100% (Documento No Patente 2). Sin embargo, entre los factores de coagulación sanguínea, hay factores que tienen una actividad muy inestable y tienen a inactivarse. Por lo tanto es muy difícil preparar dicho plasma de persona sana manteniendo la actividad de todos los factores de coagulación sanguínea en casi el 100%, y existe el problema de que la adquisición del mismo no es fácil. Además, en la preparación del plasma de una persona sana, según aumenta el número de personas cuyos plasmas se almacenan (agrupan) y mezclan, se pueden promediar las variaciones individuales de la actividad de factores de coagulación. Sin embargo, el número necesario de personas

sanas para esto no se puede asegurar en algunas instalaciones, y como se producen desviaciones en los suministradores de plasma, hay un problema en cuanto a que pueden producirse diferencias de calidad del producto entre los diferentes lotes. Además, en el método de utilización de un plasma de personas sanas, no solo se diluye el LA en el plasma de ensayo, sino que también se pueden incorporar sustancias que inhiben la medición de LA que están contenidas en el plasma de la persona sana (fosfolípidos, membranas alteradas derivadas de plaquetas, y similares). Particularmente en el caso en el que el LA es positivo débil, existe el problema de que hay la posibilidad de detectar una falsa negatividad.

Por lo tanto, existe una fuerte demanda de desarrollo de un método para medir el tiempo de coagulación sanguínea, en el que incluso para los consumidores de warfarina, las personas que sufren deficiencia de vitamina K, o pacientes con fallo hepático, se pueda llevar a cabo la detección de LA fácilmente con alta sensibilidad en comparación con el método recomendado por la ISTH que se ha descrito anteriormente, sin estar afectado por la deficiencia de los factores de coagulación sanguínea.

Medios para resolver el problema

Los inventores de la presente invención llevaron a cabo una investigación completa, y como resultado, los inventores descubrieron que cuando se mide el tiempo de coagulación sanguínea después de que se añade un factor de coagulación sanguínea específico a una muestra que se va a ensayar (por ejemplo, plasma), el tiempo de coagulación sanguínea para la detección se puede medir conveniente y sensiblemente, incluso sin utilizar plasma de una persona sana. Por lo tanto, los inventores completan la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona un método para medir el tiempo de coagulación sanguínea para la detección de LA, incluyendo el método la adición de una composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea a una muestra de sangre antes de la medición o en el momento de la medición del tiempo de coagulación sanguínea, y medir el tiempo de coagulación sanguínea.

Además, la presente invención proporciona el uso de un reactivo que incluye, como ingrediente principal, una composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea, cuyo reactivo se utiliza en combinación con un reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea para detectar el anticoagulante de lupus.

Además, la presente invención proporciona un kit de reactivos para la medición del tiempo de coagulación sanguínea para detectar el anticoagulante de lupus, conteniendo el kit de reactivos los siguientes (A) y (B):

- (A) un reactivo para medir el tiempo de tromboplastina parcial activada o un reactivo para medir el tiempo de veneno diluido de víbora de Russel; y
- (b) un reactivo que contiene, como ingrediente principal, una composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea.

Efecto de la invención

De acuerdo con el método de la presente invención, incluso en el caso en el que los factores de coagulación dependientes de la vitamina K ((FII, FVII, FIX y FX) son deficientes, por ejemplo, en muestras sanguíneas derivadas de consumidores de warfarina, las personas que tienen deficiencias de vitamina K, o pacientes con fallo hepático (pacientes que padecen cirrosis hepática, hepatitis aguda o hepatitis crónica, y similares), la presencia o ausencia de LA se puede controlar conveniente y sensiblemente. Por lo tanto, se pueden determinar protocolos terapéuticos correctos para los pacientes con LA. Además, como no es necesario preparar plasma de personas sanas, el problema de las diferencias entre diferentes lotes de los plasmas de personas sanas, que hasta ahora ha sido problemático, y también se puede resolver el problema de la dificultad de adquisición estable. Además, lo que se debería mencionar específicamente para el método de la presente invención es que el LA, para el que hasta ahora había la posibilidad de ser pasado por alto incluso por un ensayo de mezcla con un plasma de persona sana, se puede detectar conveniente y sensiblemente. Este es un efecto completamente sorprendente que no se había previsto en la simple idea de llevar a cabo la sustitución de adición convencional de plasma normal por la adición de componentes de plasma individuales.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama modelo que ilustra los resultados de un ensayo de mezcla de acuerdo con un método convencional. La FIG. 1(A) presenta el patrón de deficiencia de factores de coagulación; la FIG. 1(B) presenta el patrón del tipo de inhibidor de factores de coagulación; y la FIG. 1(C) presenta el patrón de un caso en el que la causa de la prolongación del tiempo de coagulación se desconoce.

La FIG. 2 es un diagrama que ilustra los resultados de un ensayo de mezcla en el caso de utilizar un plasma A sin tratar y un plasma A al que se añade plasma normal, respectivamente, como muestras.

La FIG. 3 es un diagrama que ilustra los resultados de un ensayo de mezcla en el caso de utilizar un plasma B sin tratar y un plasma B al que se añade plasma normal, respectivamente, como muestras.

La FIG. 4 es un diagrama que ilustra los resultados de un ensayo de mezcla en el caso de utilizarse un plasma A al que se añadió los reactivos auxiliares 1 a 4, como muestras.

La FIG. 5 es un diagrama que ilustra los resultados de un ensayo de mezcla en el caso de utilizarse un plasma B al que se añadió los reactivos auxiliares 1 a 4, como muestras.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

El método de medición del tiempo de coagulación sanguínea para la detección de LA de la presente invención se caracteriza porque una composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea se añade a una muestra de sangre antes de la medición o en el momento de la medición del tiempo de coagulación sanguínea.

La muestra de sangre que se utiliza en el método de la presente invención es preferentemente sangre completa o plasma, y habitualmente, la muestra de sangre se prepara añadiendo un anticoagulante tal como el citrato sódico a la sangre recolectada de un sujeto. Entre dichas muestras de sangre, en el caso de tratarse de muestras de sangre derivadas de los sujetos para los que ha sido difícil la detección convencional de LA, el método de la presente invención es particularmente útil. Ejemplos de dichas muestras de sangre incluye las muestras de sangre derivadas de consumidores de warfarina, personas que tienen una deficiencia de vitamina K, y pacientes con fallo hepático.

Con respecto al medio de medición del tiempo de coagulación sanguínea, es decir, al reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea, se puede utilizar cualquier reactivo dependiente de fosfolípidos o los medios de medición que miden el tiempo de coagulación sanguínea y que muestran sensibilidad para LA, y cualquier reactivo conocido para la medición del tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), PT diluída (dPT), APTT diluida (watt), tiempo de formación de trombos en caolín (KCT), tiempo de veneno diluido de víbora de Russell (dRVVT) y similares. Entre estos reactivos, por ejemplo, los componentes principales del reactivo para medir el tiempo de protrombina (PT) son calcio y tromboplastina tisular; los componentes principales del reactivo de medición del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) son fosfolípidos, agentes activadores del factor de contacto (cuerpos cargados negativamente tales como caolín, ácido silícico anhidro y ácido elágico) y calcio; los componentes principales de medición del tiempo de formación coágulo de caolín (KCT) son caolín y calcio; y los componentes principales del reactivo de medición del tiempo de veneno de víbora de Russel diluido (dRVVT) son el veneno de víbora de Russel y fosfolípidos. Estos componentes se pueden utilizar como reactivos independientes apropiadamente, o como reactivos mezclados. También, para los reactivos que se han descrito anteriormente, se pueden utilizar en todos los casos productos disponibles en el mercado. Ejemplos de reactivos para la medición de PT que están disponibles en el mercado incluyen COAGPIA (marca registrada) PT-S (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), THROMBOCHECK PT PLUS (fabricado por Sysmex Corp.), y STA Reagent Series PT (fabricado por Roche Diagnostics GmbH). Ejemplos de los reactivos para la medición APTT que están disponibles en el mercado incluyen COAGPIA (marca registrada) APTT-N (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.), THROMBOCHECK APTT-SLA (fabricado por Sysmex Corp.), APTT Líquido RD y PTT LA reactivo "RD" (fabricado por Roche Diagnostics GmbH). Ejemplos de la forma del reactivo incluye una forma secada que se disuelve en el momento de su uso, y la forma en solución.

Uno o más de estos reactivos y la composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea (reactivo auxiliar) de la presente invención se pueden combinar también en un kit.

Entre estos reactivos para la medición del tiempo de coagulación sanguínea, se prefieren los de PT, APTT o dRVVT desde el punto de vista de la sensibilidad para la detección de LA. Además, en el caso de la medición de PT o APTT, se prefiere emplear un ensayo de mezcla utilizando plasma normal y plasma de ensayo. En el caso de medición del dRVVT, no tiene que llevarse a cabo particularmente un ensayo de mezcla.

Con respecto a la composición de solución tampón que contiene los factores de coagulación sanguínea que se utilizan en la presente invención, se puede utilizar una composición de solución tampón que contenga al menos uno de los factores de coagulación sanguínea que se consideran que son deficientes en la muestra de sangre que se va a ensayar. La composición de solución tampón es preferentemente una composición de solución tampón que contiene un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre FII, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII, y más preferentemente una composición de solución tampón que contenga al menos un tipo o dos o más tipos seleccionados de entre FII, FVII, FIX, y FX. Además en el caso de la medición de PT, se prefiere una solución tampón que contenga un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre FII, FVII y FX. En el caso de la medición del APTT, se prefiere una solución tampón que contenga un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre FII, FVIII, FIX, FX, FXI, y FXII, y particularmente, se prefiere una composición de solución tampón que contenga un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre FIX y FX. Además en el caso de medición del dRVVT, se prefiere una composición de solución tampón que contenga un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre FII y FX. En el caso en el que la composición de solución tampón de la presente invención se añade a una muestra que se va a ensayar, la muestra se diluye por la composición de solución tampón, y disminuye la concentración de factores de coagulación sanguínea en la muestra por lo que se afecta el tiempo de coagulación, se pueden incorporar los factores de coagulación sanguínea que se necesite suplementar de acuerdo con el reactivo utilizado en la composición de solución tampón descrita anteriormente. Por ejemplo, se pueden incorporar FVIII, FXI,

y FXII para APTT, DAPTT, y KCT; se puede incorporar FVII para el PT; y se puede incorporar FX para el dRVVT.

Aquí, como solución tampón, se puede utilizar apropiadamente una solución tampón conocida tal como una buena solución tampón tal como HEPES. El pH de la solución tampón puede ser cualquier pH que no desactive los factores de coagulación sanguínea contenida en la composición de solución tampón, y el pH será preferentemente un pH de 6 a 9, y más preferentemente un pH de 6,5 a 8,0. Además, la concentración de la solución tampón puede ser cualquier concentración siempre que se mantenga la capacidad de tampón durante el almacenamiento, y la concentración es preferentemente de 5 mM a 100 mM, y más preferentemente de 5 mM a 50 mM.

La concentración de factores de coagulación sanguínea en la composición de solución tampón está, como concentración de los factores de coagulación sanguínea después de haberse añadido la composición de solución tampón a una muestra de sangre, preferentemente en el intervalo de 0,01 U/ml a 10 U/ml, y más preferentemente en el intervalo de 0,1 U/ml a 5 U/ml. La relación de mezcla de la muestra de sangre y la composición de solución tampón y la composición de solución tampón se puede fijar apropiadamente considerando la concentración de factores de coagulación sanguínea en la composición de solución tampón. La tasa de dilución de la muestra de sangre por la composición de solución tampón es preferentemente de 3 veces o menos, y más preferentemente de 2 veces o menos.

Además, en la composición de solución tampón, se puede también añadir apropiadamente un estabilizador de los factores de coagulación sanguínea. Por ejemplo, se pueden añadir glicilglicina, glicilglicilglicina, y similares que se desvelan en la Publicación de Solicitud de Patente japonesa (JP-B) N° 06-050999. Además, también se pueden añadir un conservante, un agente de ajuste de la intensidad iónica, y similares siempre que no se perjudiquen los efectos de la presente invención.

En el método de la presente invención, una composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea se añade a una muestra de sangre antes de la medición o en el momento de la medición del tiempo de coagulación sanguínea. Aquí, la adición de la composición de solución tampón antes de la medición del tiempo de coagulación sanguínea corresponde a un pretratamiento de la muestra de sangre. Es decir, la composición de solución tampón se añade a una muestra de sangre para pretratar la muestra de sangre, y luego se mide el tiempo de coagulación sanguínea utilizando un reactivo para la medición de coagulación sanguínea. Por otra parte, la adición de la composición de solución tampón en el momento de la medición del tiempo de coagulación sanguínea a un procedimiento de adición de la composición de solución tampón a una parte del reactivo para la medición de la coagulación sanguínea y la medición del tiempo de coagulación sanguínea. Entre estos tiempos de adición, es preferible añadir la composición de solución tampón a la muestra de sangre antes de la medición del tiempo de coagulación sanguínea, desde el punto de vista de que se asegura fácilmente la estabilidad de almacenamiento de los factores de coagulación incorporados en la composición de solución tampón.

Con respecto al método para la medición del tiempo de coagulación sanguínea, se pueden utilizar adecuadamente por ejemplo, un método de detección de la coagulación midiendo el cambio óptico tal como un cambio en la luz transmitida o un cambio en la luz dispersada, que cambia junto con la reacción de coagulación sanguínea que se producir como resultado de la adición de un reactivo que contiene calcio y fosfolípidos (reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea) a una muestra de sangre, o por la medición física de la viscosidad de la muestra medida.

Con respecto al calcio, es preferentemente utilizar una sal entre un ácido inorgánico y calcio. Ejemplos de dicha sal de calcio incluye el cloruro cálcico. Además, ejemplos de una sal de calcio distinto de la sal entre un ácido inorgánico y calcio incluyen lactato cálcico. La concentración de calcio en el reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea se puede fijar apropiadamente de acuerdo con el tipo de método de medición del tiempo de coagulación sanguínea. Por ejemplo, en el caso del método de medición APTT, la concentración de calcio es preferentemente de aproximadamente 20 mM a 25 mM, y en el caso del método de medición PT, la concentración de calcio es preferentemente de 10 nM a 12,5 mM.

Con respecto a los fosfolípidos, los fosfolípidos que se han utilizado hasta ahora en los reactivos para la medición del tiempo de coagulación sanguínea se pueden utilizar adecuadamente. No hay limitaciones particulares en las cadenas laterales de ácidos grasos de los fosfolípidos, pero se prefieren el ácido palmítico, ácido oleico, y ácido esteárico. Ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, y fosfatidilcolina. Además, los fosfolípidos pueden ser fosfolípidos de origen natural tales como los derivados de cerebro bovino, derivados de cerebro de conejo, derivados de placenta humana, y fosfolípidos derivados de soja, o pueden ser fosfolípidos producidos por modificación genética. La concentración de fosfolípidos en una muestra de medición es preferentemente, por ejemplo, de 1 µg/ml a 200 µg/ml, en un reactivo para APTT, 10 µg/ml a 300 µg/ml en un reactivo para PT, y 1 µg/ml a 300 µg/ml en un reactivo de medición para dRVVT.

El pH del reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea puede fijarse apropiadamente considerando el pH en el momento en que se mezcla el reactivo con la composición de solución tampón de la presente invención; sin embargo, el pH del reactivo para la propia medición preferentemente será un pH de 6,0 a 8,0, y más preferentemente un pH de 7,0 a 7,6. El pH se puede regular apropiadamente utilizando un agente tampón

que se utiliza en reactivos convencionales para la medición del tiempo de coagulación sanguínea. Ejemplos de un agente tampón incluyen HEPES y TRIS, pero los ejemplos no se limitan a estos.

El reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea puede contener un componente que está contenido en los reactivos conocidos convencionalmente para la medición del tiempo de coagulación sanguínea, además de los componentes descritos anteriormente. Ejemplos de dicho componente incluyen un agente activador, veneno de serpiente y factores tisulares. Ejemplos de un agente activador incluyen el ácido elágico, caolín, Celita, sílice coloidal, ácido silícico coloidal, alúmina, y magnesio. Ejemplos de venenos de serpiente incluye el veneno de víbora de Russell, veneno de serpiente Textarina, y veneno de serpiente Ecrina. Ejemplos de los factores tisulares incluyen las tromboplastinas tisulares naturales tales como las tromboplastinas tisulares derivadas de cerebro de conejo, derivadas de placenta humana, y derivadas de cerebro bovino; y la tromboplastina tisular recombinada genéticamente.

El método de la presente invención también se puede aplicar al ensayo de corrección de la coagulación sanguínea (ensayo de mezcla) descrito en el Documento No Patente 1. Es decir, el método se puede aplicar a un método de adición de una muestra de sangre normal a una muestra de sangre que se va a ensayar, y determinar hasta qué punto se corrige el tiempo de coagulación sanguínea, representándolo en un gráfico.

Más particularmente, por ejemplo, una muestra de plasma diluida por la adición de Plasma Normal Agrupado (fabricado por Precision Biologic, Inc.; abreviado, de aquí en adelante como PNP) como plasma normal o la composición de solución tampón de la presente invención al plasma de ensayo a 1:1, se utiliza como una muestra que se va a ensayar. Las muestras se prepararon añadiendo plasma normal a esta muestra que se va a ensayar, y mezclar esta muestra que se va a ensayar con el plasma normal de manera que las proporciones del plasma normal sean un 0%, 20%, 50%, 80% y 100%, y se lleva a cabo la medición del APTT. Los resultados se representan en un gráfico (eje horizontal: proporción de plasma normal mezclado, o proporción de plasma de ensayo (%); eje vertical: tiempo de coagulación (segundos)), y el tiempo de coagulación sanguínea se puede determinar visualmente por la forma del gráfico.

Cuando se utiliza el método de la presente invención, solo necesita simplemente llevar a cabo la medición convencional del tiempo de coagulación sanguínea, excepto que simplemente se añade la composición de solución tampón descrita anteriormente, y de esta manera se puede detectar con precisión la presencia o ausencia de LA y determinar incluso con una muestra de sangre derivada de un consumidor de warfarina, una persona que tiene deficiencia de vitamina K, o un paciente con fallo hepático.

La composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea se puede utilizar como un reactivo auxiliar que se utiliza en combinación con un agente para la medición del tiempo de coagulación sanguínea para detectar el anticoagulante de lupus.

Además, una combinación de (A) un reactivo para la medición del tiempo de tromboplastina parcial activada o un reactivo para la medición del tiempo de veneno de víbora de Russell diluido, con (b) un reactivo auxiliar incluyendo una composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea como ingrediente principal, es útil como un kit de reactivos para la medición del tiempo de coagulación sanguínea para detectar el anticoagulante de lupus.

Ejemplos

La presente invención se describirá con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos, pero la presente invención no pretende limitarse a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1

Se diluyó un plasma de ensayo con cada uno de los reactivos auxiliares descritos en la Tabla 1 a 1:1, y las mezclas se utilizaron como muestras para llevar a cabo un ensayo de mezcla convencional. Se hizo una comparación entre las formas de curva en los gráficos.

< Artículo de medición >

(1) Ensayo de exploración por APTT

Se llevó a cabo utilizando el reactivo PTT LA, "RD" (fabricado por Roche Diagnostics GmbH), y un analizador de coagulación de sangre automático, STA-R (fabricado por Roche Diagnostics GmbH). Para la determinación, se utilizó el valor de corte descrito en el prospecto del reactivo. El reactivo relevante es un reactivo para llevar a cabo la medición utilizando una solución de cloruro cálcico auto-producida, aparte de un reactivo PTT LA que contiene cefalina que es un fosfolípido, y sílice que es un agente activador del factor de contacto (cuerpo cargado negativamente). El reactivo se puede utilizar para el método de la presente invención en combinación con la composición de solución tampón que contiene los factores de coagulación sanguínea (reactivo auxiliar) de la

presente invención.

(2) Ensayo dRVVT

- 5 Se llevó a cabo la medición utilizando el ensayo de LA "GRADIPORE" (fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) y un analizador automático de coagulación sanguínea, STA-R. Para la determinación, se utilizó el valor de corte descrito en el prospecto del reactivo. El reactivo relevante está compuesto por el Reactivo 1 que contiene veneno de víbora de Russell y fosfolípidos, y el Reactivo 2 que contienen veneno de víbora de Russell y una cantidad excesiva de fosfolípidos, y el reactivo se puede utilizar para el método de la presente invención en combinación con la composición de solución tampón que contiene los factores de coagulación sanguínea (reactivo auxiliar) de la presente invención.

(3) Ensayo de neutralización de fosfolípidos

- 15 Se llevó a cabo la medición utilizando el reactivo STACLOT LA (fabricado por Roche Diagnostics GmbH) y un analizador de coagulación sanguínea ST4 (fabricado por Roche Diagnostics GmbH). Para la determinación, se utilizó el valor de corte descrito en el prospecto del reactivo.

(4) Ensayo de mezcla

- 20 La medición se llevó a cabo utilizando el reactivo PTT LA, "RD" (fabricado por Roche Diagnostics GmbH), y un analizador de coagulación sanguínea automático, CP2000 (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.). Como plasma normal, se utilizó Plasma Normal Agrupado (de aquí en adelante PNP; Precision Biologic, Inc.). La proporción de mezcla de muestras se fijó al 0%, 10%, 20%, 50% y 100%, y la medición se llevó a cabo diluyendo automáticamente la muestra utilizando la función de ensayo de mezcla del CP2000. La determinación se hizo de forma que se dibujó un gráfico, y si el gráfico era convexo ascendente, se determinaba que la muestra era LA-positiva. Si la determinación era difícil se consideraba como pendiente de determinación.

(5) Modificación del ensayo de mezcla

- 30 Se llevó a cabo la medición de la misma manera que en (4) insertando muestras obtenidas por dilución de un plasma de ensayo con PNP o los reactivos auxiliares 1 a 4 que se describirán posteriormente con una relación de 1:1, en cubetas de muestra en el CP2000. Se hizo la determinación de manera que se dibujó un gráfico, y si el gráfico era convexo ascendente, se determinaba que la muestra era LA-positiva. Si la determinación era difícil, se consideraba como pendiente de determinación.

<Composición de solución tampón: reactivo auxiliar>

- 40 Se prepararon varios agentes auxiliares añadiendo los factores de coagulación sanguínea indicados en la Tabla 1 a HBS (50 mM de HEPES pH 7,5, y 150 mM de cloruro sódico) como base. Para los factores de coagulación sanguínea, se utilizaron en todos los casos los productos fabricados por Haematologic Technologies.

[Tabla 1]

Composición de reactivo auxiliar				
	Factor IX humano	Factor X humano	Factor XII humano	Factor VIII humano
Reactivo auxiliar 1	2 U/ml	2 U/ml	-	-
Reactivo auxiliar 2	2 U/ml	2 U/ml	-	1 U/ml
Reactivo auxiliar 3	2 U/ml	2 U/ml	2 U/ml	-
Reactivo auxiliar 4	2 U/ml	2 U/ml	2 U/ml	1 U/ml

- 45 Composición de reactivos auxiliares

<Plasma de ensayo>

- 50 Los plasmas de ensayo A y B eran ambos plasmas recolectados de pacientes que recibían una administración de warfarina.

<Resultados>

- 55 Como se muestra en la Tabla 2, el plasma A era positivos en todos los exámenes de LA incluyendo el ensayo de exploración APTT, el ensayo dRVVT, y el método de neutralización de fosfolípidos. El plasma B era positivo para LA en el ensayo de exploración APTT y el ensayo de dRVVT.

[Tabla 2]

Resultados y determinación del ensayo de LA										
Artículo	Exploración APTT		dRWT				Método de neutralización de fosfolípidos			
Unidad	seg	Determinación	seg	seg	Relación	Determinación	seg	seg	Δseg	Determinación
Valor de corte	47				1,3				8	
Plasma A	143,0	Positivo	220,4	82,5	2,67	Positivo	132,0	86,0	46,0	Positivo
Plasma B	57,4	Positivo	77,9	54,8	1,42	Positivo	47,7	47,8	-0,1	Negativo

Como se indica en las filas de No tratados en la Tabla 3, el diagrama de la izquierda en la FIG. 2, y el diagrama de la izquierda de la FIG. 3, los plasmas A y B muestran ambos una tendencia a ser convexos descendentes en el ensayo de mezcla, y se determinan como LA-negativos. Entre las modificaciones del ensayo de mezcla, en el método que utiliza plasma normal (PNP) que se recomienda en general, el plasma A da un gráfico en forma de S que es casi una línea recta, y era difícil determinar si la curva era convexa ascendente o convexa descendente (en la fila de plasma normal añadido de la Tabla 3, y el diagrama de la derecha en la FIG. 2). Por el contrario, cuando se utilizaban los reactivos auxiliares 1 a 4 de la presente invención, el plasma A daba gráficos que eran claramente convexos ascendentes, y por lo tanto se determinaban fácilmente que eran positivos (en las filas de los reactivos auxiliares de la Tabla 3, y la FIG. 4). El plasma B daba gráficos que eran claramente convexos descendentes, y se determinaba que eran negativos (en la columna de reactivo auxiliar de la Tabla 3, y la FIG. 5).

[Tabla 3]

Ensayo de mezcla y modificación de ensayo de mezcla							
Muestra		Determinación	Proporción de Muestra				
Plasma de ensayo	Tratamiento		0%	10%	20%	50%	100%
Plasma A	No tratados	Negativo	34,1	49,4	57,4	88,2	166,1
	Adición de plasma normal	Pendiente de determinación	34,6	43,4	47,3	60,0	87,8
	Adición de Reactivo auxiliar 1	Positivo	34,2	45,1	46,6	55,2	73,8
	Adición de Reactivo auxiliar 2	Positivo	34,2	42,4	43,7	46,4	46,0
	Adición de Reactivo auxiliar 3	Positivo	34,2	44,2	45,9	53,8	71,3
	Adición de Reactivo auxiliar 4	Positivo	34,2	41,4	41,9	42,6	42,2
Plasma B	No tratados	Negativo	34,4	35,3	36,4	40,3	56,6
	Adición de plasma normal	Negativo	33,2	33,6	33,9	35,9	39,7
	Adición de Reactivo auxiliar 1	Negativo	34,1	33,6	34,0	35,8	47,0
	Adición de Reactivo auxiliar 2	Negativo	34,1	33,5	32,6	31,5	35,0
	Adición de Reactivo auxiliar 3	Negativo	34,1	33,2	33,2	32,4	37,3
	Adición de Reactivo auxiliar 4	Negativo	34,1	32,1	30,7	27,6	28,6

De acuerdo con la presente invención, se determinaba fácilmente que la determinación de negatividad en el ensayo de mezcla del plasma A era un falso negativo debido a la administración de warfarina, y actualmente era LA-positivo. Esto no se podía descubrir por el ensayo de mezcla convencional o con la modificación del ensayo de mezcla. Además. El plasma B era positivo en el ensayo de exploración ATPP y el ensayo dRVVT, pero se determinó que la determinación era un falso positivo en todos los casos debido a la administración de warfarina, y era actualmente LA-negativo.

Ejemplo 2

Se añadió un volumen de 0,5 del reactivo auxiliar descrito posteriormente a un volumen de 9,5 de un plasma de ensayo, y se mezclaron los componentes para preparar una muestra de medición. De esta manera, la muestra se sometió a un ensayo dRVVT, y se determinó así la relación del tiempo de coagulación.

<Artículo de medición>

(1) Ensayo dRVVT

Se llevó a cabo un ensayo dRVVT utilizando el DVVtest (marca registrada) y DVVconfirm (fabricados por Sekisui Diagnostics, LLC) como reactivos para medición del tiempo de coagulación sanguínea, y utilizando un tiempo de incubación de la muestra de medición de 216 segundos y los parámetros del punto de coagulación APTT en un analizador de coagulación sanguínea automático, CP2000 (fabricado por SEKISUI MEDICAL CO., LTD.). El valor de corte (t/c) del presente Ejemplo se fijó en 1,3 o menos, y se llevó a cabo la determinación del LA. Los reactivos relevantes estaban compuestos por el reactivo DVVtest (marca registrada) que contiene el veneno de víbora de Russell, una cantidad excesiva de fosfolípidos y calcio. Los reactivos se pueden utilizar en el método de la presente invención en combinación con la composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea (reactivo auxiliar) de la presente invención.

<Composición de solución tampón de la presente invención: reactivo auxiliar>

Se combinaron el FX y FII de manera que la concentración de FX sería de 20 veces la concentración descrita en la fila de la Tabla 4, y la concentración de FII sería de 20 veces la concentración descrita en la columna de la Tabla 4, y los factores se disolvieron en HBS para preparar 28 diferentes reactivos auxiliares. Para los productos FX y FII, se utilizaron los productos de Haematologic Technologies, Inc.

<Plasma de ensayo>

Como plasma LA-negativo sin administración de warfarina: plasma L(-)W(-), se utilizó AK CALIBRANT A (fabricado por Sysmex Corp.); como plasma LA-negativo con administración de warfarina: plasma L(-)W(+), se utilizó AK CALIBRANT D (fabricado por Sysmex Corp.); como plasma LA-positivo sin administración de warfarina: plasma L(+)W(-), se utilizó Plasma Anticoagulante de Lupus (fabricado por Trina Bioreactives AG); y como plasma LA-positivo con administración de warfarina: plasma L(+)W(+), se utilizó plasma anticoagulante de Lupus (fabricado por Busicom, Inc.).

<Resultados>

Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Cuando no se añaden ni FII ni FX (0 U/ml) se determinaba de manera que:

el plasma de L(-)W(-) es LA-negativo;
el plasma de L(-)W(+) es LA-negativo;
el plasma de L(+)W(-) es LA-positivo; y
el plasma de L(+)W(+) es LA-negativo, y

los resultados de la falsa negatividad de LA se obtuvieron en el plasma de L(+)W(+).

Además, el plasma de L(-)W(+) era LA-negativo, pero el valor t/c era de 0,62, que es un valor anormal.

A este respecto, cuando uno cualquiera o más de FII y FX se añadía a distintos plasmas de ensayo, solamente el valor t/c del plasma de L(+)W(+) aumentaban hasta un valor mayor o igual que el valor de corte, mientras que se mantenían los resultados de determinación para el plasma de L(-)W(-), el plasma de L(-)W(+), y el plasma L(+)W(-). Por lo tanto, los resultados de positividad de LA que se deberían obtener se obtienen.

Además, cuando se añade uno cualquiera o más de FII o FX al plasma de L(-)W(+), el valor t/c se aproximaba casi a 1, y se confirmaba que la influencia de la administración de warfarina podía estar reducida. Cuando este valor y el valor del plasma de L(+)W(+) se tomaban en consideración, esto implicaba que el ensayo de dRVVT utilizando el método de la presente invención puede detectar con precisión el LA incluso en el caso de que se administra warfarina. Por lo tanto, el método de la presente invención es muy útil en, por ejemplo, el control del efecto terapéutico de LA durante la administración de warfarina.

[Tabla 4]

	FII	U/ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
FX (U/ml)	LA	W	t/c	t/c	t/c	t/c	t/c	t/c
0	—	.	1,04					1,14
	—	+	0,62					0,86
	+	—	2,21					2,16
	+	+	1,26					2,22
0,1	—	—		1,06	1,08	1,07	1,09	1,11
	—	+		0,84	0,90	0,91	0,94	0,97
	+	—		2,31	2,33	2,36	2,36	2,37
	+	+		1,95	2,21	2,35	2,40	2,43
0,2	—	—		1,09	1,11	1,12	1,11	1,07
	—	+		0,88	0,92	0,90	0,93	0,94
	+	—		2,36	2,43	2,41	2,42	2,28
	+	+		2,10	2,39	2,37	2,54	2,09
0,3	—	—		1,11	1,12	1,11	1,12	1,12
	—	+		0,89	0,98	0,93	0,97	0,99
	+	—		2,37	2,46	2,44	2,43	2,43
	+	+		2,05	2,39	2,40	2,47	2,51
0,4	—	—		1,11	1,11	1,13	1,14	1,14
	—	+		0,87	0,94	0,96	0,99	1,03
	+	—		2,45	2,48	2,48	2,47	2,46
	+	+		2,13	2,30	2,49	2,59	2,58
0,5	—	—	1,11	1,10	1,12	1,12	1,14	1,14
	—	+	0,98	0,97	0,88	0,95	1,00	1,02
	+	—	2,35	2,35	2,37	2,46	2,47	2,45
	+	+	2,06	1,99	2,20	2,43	2,57	2,65

De acuerdo con el método de la presente invención, incluso cuando se medía el plasma de un sujeto (+) que a veces se determinaba como LA-negativo (falso negativo) por el ensayo dRVVT, pero es LA-positivo (+) y también recibe la administración de warfarina (+) (plasma de L(+)W(+)), la determinación correcta, es decir de LA-positivo, se hacía sin que estuviera afectada por la administración de warfarina.

REIVINDICACIONES

1. Un método de medición del tiempo de coagulación sanguínea para detectar el anticoagulante de lupus, comprendiendo el método la adición de una composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea a una muestra de sangre antes de la medición o en el momento de la medición del tiempo de coagulación sanguínea, y medir el tiempo de coagulación sanguínea.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde los factores de coagulación sanguínea son un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en FII, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la muestra de sangre es sangre completa o plasma.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea se añade a la muestra de sangre antes de la medición del tiempo de coagulación sanguínea.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la muestra de sangre se deriva de una persona que se selecciona de entre un consumidor de warfarina, una persona que tiene deficiencia de vitamina K, y un paciente con fallo hepático.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde los medios de medición para el tiempo de coagulación sanguínea es el tiempo de tromboplastina parcial activada o el tiempo de veneno de víbora de Russell diluido.
7. El uso de un reactivo que comprende como ingrediente principal, una composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea que son un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en FII, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII, en combinación con un reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea, para detectar el anticoagulante de lupus.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde los factores de coagulación sanguínea son un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en FII, FVII y FX.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, donde el reactivo para la medición del tiempo de coagulación sanguínea para detectar el anticoagulante de lupus se un reactivo que se utiliza para la medición del tiempo de tromboplastina parcial activada o el tiempo de veneno de víbora de Russell diluido.
10. Un kit de reactivos para la medición del tiempo de coagulación sanguínea para detectar el anticoagulante de lupus, comprendiendo el kit de reactivos los siguientes (A) y (B):
 - (A) un reactivo para la medición del tiempo de tromboplastina parcial activada o un reactivo para la medición del tiempo de veneno de víbora de Russell diluido; y
 - (B) un reactivo que contiene, como ingrediente principal, una composición de solución tampón que contiene factores de coagulación sanguínea.
11. El kit de reactivos de acuerdo con la reivindicación 10, donde los factores de coagulación sanguínea son un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en FII, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI y FXII.
12. El kit de reactivos de acuerdo con la reivindicación 10, donde los factores de coagulación sanguínea son un tipo o dos o más tipos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en FII, FVII y FX.