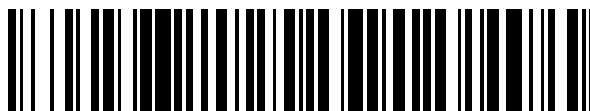


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 421**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 9/74 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2010 E 10153604 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2316931**

54 Título: **Peptidasas acopladas a polímero**

30 Prioridad:

30.10.2009 EP 09013711

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

28.06.2017

73 Titular/es:

**SENOVA GESELLSCHAFT FÜR
BIOWISSENSCHAFT UND TECHNIK MBH
(100.0%)
Industriestrasse 8
99427 Weimar, DE**

72 Inventor/es:

**KOLDE, HANS-JÜRGEN;
LANGE, UTE y
BUCHA, ELKE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 620 421 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

Peptidasas acopladas a polímero

- Las peptidasas (también denominadas como proteinasas o proteasas) son enzimas, que catalizan la escisión de enlaces peptídicos en péptidos o proteínas. En la forma de las endopeptidasas prefieren como componente de reacción enlaces peptídicos dentro de la molécula objetivo, en los que participan en la mayoría de los casos determinados aminoácidos. Otras peptidasas escinden desde el extremo N o C terminal de la proteína aminoácidos individuales o varios aminoácidos. A este respecto, las distintas endopeptidasas, en función de su estructura terciaria, pueden con frecuencia reaccionar con distintos componentes de reacción fisiológicos o no fisiológicos, que contienen distintos enlaces peptídicos específicos, de diferente tamaño molecular.
- Las peptidasas tienen funciones importantes en el organismo y participan en múltiples procesos tales como, por ejemplo, en la digestión de proteínas, la respuesta inmunitaria (sistema del complemento), la coagulación sanguínea y la fibrinólisis en sus desarrollos fisiológicos pero también patológicos.
- En algunos casos, las endopeptidasas activadas forman para ello también aún complejos macromoleculares con cofactores, así por ejemplo el factor de coagulación activado Xa con factor Va en el complejo protrombinasa.
- Para determinados procedimientos de diagnóstico, pero también procedimientos terapéuticos, es sin embargo desventajoso este espectro de componentes de reacción para un uso dirigido, específico de enzimas de este tipo.
- El proceso de la coagulación sanguínea es un proceso de varias etapas muy complejo, en el que se activan precursores enzimáticos inactivos mediante acciones enzimáticas con la acción conjunta de cofactores para dar enzimas de coagulación activas.
- Para balancear el equilibrio entre la disposición de coagulación de la sangre y garantizar sus propiedades de flujo en la circulación, existe además un sistema integrado de interacciones de acción inhibitoria o de refuerzo con moléculas adicionales, que se controla por numerosos mecanismos de retroacoplamiento positivo y negativo.
- Para el tratamiento de trastornos del sistema de coagulación sanguínea se desarrollaron y se desarrollan nuevas clases de fármacos que inhiben de manera completamente dirigida solamente una única enzima de la cascada de coagulación, tal como por ejemplo el factor Xa activado (clase de principio activo de las sustancias inhibitorias de factor Xa de acción directa por ejemplo Rivaroxaban®, Apixaban®, Betrixaban®, Otamixaban®, Edoxaban®, Eribaxaban, YM150, LY-517717, PRT054021 entre otros) o la trombina (clase de principios activos de las sustancias inhibitorias de trombina de acción directa, por ejemplo Dabigatran®, argatroban, bivalirudina, MCC-977, AZD0837, NU172, flovagatran, entre otros).
- Para garantizar una terapia efectiva (prevención de trombosis) y segura (prevención de hemorragias) con fármacos de este tipo es importante tanto la disponibilidad de métodos de detección exactos correspondientes del principio activo en fluidos corporales como también la posibilidad de poder neutralizar o eliminar estos fármacos.
- Para poder medir de manera dirigida fármacos que inhiben de manera específica enzimas del sistema hemostático, o para poder neutralizarlas *in vitro* o *in vivo*, sería ventajoso poder modificar o limitar el espectro de posibilidades de reacción de las enzimas respectivas.
- De manera correspondiente, para el desarrollo de antídotos contra sustancias inhibitorias de factor Xa y trombina, se han conocido modificaciones de la estructura molecular de trombina y factor Xa, a través de las que estas peptidasas pierden su funcionalidad y capacidad de interacción en el sistema de coagulación, pero aún pueden interactuar con los principios activos inhibitorios específicos. Las peptidasas modificadas de este modo se emplearán para la neutralización del principio activo. Se designa neutralización a este respecto una unión de la molécula de principio activo a la peptidasa, que lleva a que la molécula de principio activo ya no pueda ejercer su función como inhibidor del sistema hemostático. Esto se consigue mediante la eliminación de aminoácidos especiales y/o mediante su cambio. Para ello se divulgan procedimientos costosos, entre otros, en el documento US 6 060 300 (Thrombin muteins as antidotes for thrombin inhibitors) y en el documento WO 2009/041962 (Antidotes for Factor Xa inhibitors and methods of using the same). El documento US 2009/0098119A1 describe además que la vida media, en sí corta, de los mutantes de factor Xa, puede prolongarse mediante una reacción con polietilenglicol, pero no que mediante esta modificación cambian otras propiedades de la molécula de factor Xa mutada.
- Era objetivo de la presente invención proporcionar procedimientos para la detección o determinación cuantitativa de un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático en una muestra.
- Además, era objetivo de la presente invención proporcionar procedimientos *in vitro* para la neutralización de la actividad inhibitoria de un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático.
- Se divulga modificar de manera sencilla la especificidad de las peptidasas del sistema hemostático, tales como por ejemplo las peptidasas del sistema de coagulación, en particular para poder emplear las peptidasas modificadas de este modo para la detección o para la neutralización de fármacos que actúan como sustancias inhibitorias sobre las peptidasas del sistema de coagulación. Se divulga la provisión de peptidasas modificadas que pueden reaccionar con

los inhibidores y sustratos que van a detectarse o neutralizarse, pero pierden esencialmente su capacidad de reacción en el sistema de coagulación.

5 Se comprobó sorprendentemente que las peptidasas del sistema hemostático o del sistema de coagulación, tales como factor Xa o trombina, tras el acoplamiento a uno o varios polímeros, en particular polialquilenglicoles y copolímeros, que comprenden unidades de alquilenglicol, pierden su capacidad de reacción en el sistema de coagulación, pero, al mismo tiempo, pueden reaccionar aún con inhibidores y sustratos de menor tamaño molecular. Las peptidasas modificadas de este modo del sistema hemostático se denominan en adelante, para simplificar, también "peptidasas acopladas a polímero".

10 La peptidasa, que se acopla en este caso con uno o varios polímeros, es una peptidasa del sistema hemostático, en particular del sistema hemostático de un mamífero, tal como el ser humano. Esta puede obtenerse de diferente manera, e incluye tanto peptidasas recombinantes como peptidasas obtenidas a partir de organismos, en particular de sangre, así como sus fragmentos o mutantes. Los mutantes de las peptidasas se diferencian de las peptidasas nativas correspondientes porque, uno o más, preferentemente de 1 a 10 restos de aminoácido están deletados o insertados o cambiados por, en cada caso, un resto de aminoácido. Pueden proporcionarse mediante procedimientos conocidos, tales como, por ejemplo, procedimientos sintéticos o mutagénesis dirigida al sitio. Idealmente, los fragmentos y mutantes de las peptidasas mencionadas en este caso muestran al menos el 80 %, más preferentemente el 90 % de la actividad biológica y en particular la misma actividad biológica que la peptidasa nativa correspondiente, pudiendo determinarse la actividad con procedimientos conocidos en la especialidad. Es decir, el fragmento o los mutantes correspondientes, cuando no están acoplados a un polímero, tiene preferentemente el mismo efecto fisiológico e interacciona con las mismas sustancias con el mismo efecto biológico que la peptidasa nativa correspondiente.

15 Preferentemente, en el caso de la peptidasa del sistema hemostático se trata de un factor de coagulación en su forma activada. Se divulga un factor de coagulación seleccionado de factor IIa (trombina), VIIa, IXa, Xa y XIa. Se prefieren especialmente trombina y factor Xa. Así mismo, se prefiere el uso de una forma nativa de las proteinasas para el acoplamiento a uno o varios polímeros.

20 Los polímeros que van a acoplarse en este caso a peptidasas de este tipo son compuestos químicos de cadenas moleculares y/o moléculas ramificadas que se componen preferentemente de unidades iguales o similares. A estos pertenecen polímeros sintéticos, tales como por ejemplo polialquilenglicoles o también biopolímeros, tales como por ejemplo moléculas con unidades de hidrato de carbono o secuencias de aminoácidos repetitivas que puede derivatizarse, dado el caso, mediante sustitución. Ejemplos son dextrano o hidroxietilalmidón. En la industria farmacéutica se acoplan algunos de estos polímeros a principios activos, para, de esta manera prolongar su vida media en el organismo. Procedimientos de este tipo son, por ejemplo la PEGilación, HESilación y PASilación.

25 El polímero, que se acopla en este caso a una peptidasa del sistema hemostático, tiene habitualmente una masa molecular media (promedio en peso) de al menos 1.000 Da, preferentemente al menos 2000 Da y en particular al menos 5.000 Da. Además, la masa molecular asciende habitualmente a como máximo 60.000, preferentemente como máximo 40.000 Da y en particular como máximo 20.000 Da.

El polímero puede ser ramificado o lineal, se prefieren los polímeros lineales.

30 Se divulga, para el polímero de la peptidasa acoplada a polímero también un polialquilenglicol o un copolímero que comprende unidades de alquilenglicol. La parte de alquileo de las unidades de alquilenglicol del polialquilenglicol o del copolímero comprende preferentemente de 1 a 6, de manera especialmente preferente 2 o 3 átomos de C. Los copolímeros contienen preferentemente por lo menos el 50 % en moles, de manera especialmente preferente al menos el 70 % en moles y en particular al menos el 90 % en moles, con respecto a la cantidad total de las unidades de repetición en el copolímero, de unidades de repetición de fórmula -Alk-O-, en el que "Alk" representa un grupo alquileo tal como se definió anteriormente.

35 De manera especialmente preferente, en el caso del polímero se trata de un polietilenglicol (también denominado PEG) o un copolímero que comprende unidades de etilenglicol. Los copolímeros contienen preferentemente por lo menos el 50 % en moles, de manera especialmente preferente al menos el 70 % en moles y en particular al menos el 90 % en moles, con respecto a la cantidad total de las unidades de repetición, de unidades de repetición de fórmula -CH₂-CH₂-O-.

40 En una forma de realización de especialmente preferida, en el caso de la peptidasa, se trata del factor de coagulación Xa y en el caso del polímero, se trata de polietilenglicol con una masa molecular media (promedio en peso) de habitualmente al menos 1.000 Da, preferentemente al menos 2000 Da y en particular al menos 5.000 Da. Además, la masa molecular media asciende habitualmente como máximo a 60.000, preferentemente como máximo 40.000 Da y en particular como máximo 20.000 Da. En una forma de realización especialmente preferida adicional, en el caso de la peptidasa, se trata del factor de coagulación trombina y en el caso del polímero, se trata de polietilenglicol con una masa molecular (promedio en peso) de habitualmente al menos 1.000 Da, preferentemente al menos 2000 Da y en particular al menos 5.000 Da. Además, la masa molecular media asciende habitualmente como máximo a 60.000, preferentemente como máximo 40.000 Da y en particular como máximo 20.000 Da.

El acoplamiento del polímero a la peptidasa tiene lugar preferentemente mediante un enlace covalente que puede generarse con procedimientos químicos convencionales. Por regla general, el polímero se activa con ello en un extremo terminal para poder reaccionar con un grupo funcional de la peptidasa. En el caso de un polialquilenglicol, pueden usarse a este respecto derivados reactivos conocidos, tales como, por ejemplo, succinimidilsuccinato, succinimidilpropionato, nitrofenilcarbonato, tresilato, epóxidos, aldehídos, isocianatos, maleimidas y similares (Veronese FM, Pasut G: PEGylation, successful approach to drug delivery. DDT 2005; 10:1451-1458). Una molécula de peptidasa puede acoplarse a una o varias moléculas de polímero, por ejemplo de 1 a 10 moléculas de polímero. La relación molar de peptidasa/polímero se controla mediante las cantidades empleadas en la reacción de acoplamiento.

Se comprobó que mediante el acoplamiento de la peptidasa con el polímero se modifica la especificidad, es decir, en particular la especificidad de sustrato de la peptidasa, de modo que la peptidasa pierde su capacidad de reacción en el sistema hemostático o la capacidad de reacción está significativamente limitada. En particular pierde su capacidad de reacción con receptores fisiológicos macromoleculares, sustratos macromoleculares, cofactores macromoleculares e inhibidores macromoleculares. En el caso de los receptores fisiológicos macromoleculares, sustratos macromoleculares, cofactores macromoleculares e inhibidores macromoleculares se trata con frecuencia de proteínas y polipéptidos. En este contexto, la pérdida o la limitación significativa de la capacidad de reacción en el sistema hemostático significa, por ejemplo, que la peptidasa ya no puede, o solo aún en un grado mínimo, cumplir su función fisiológica y/o convertir los sustratos macromoleculares mencionados. Esto puede mostrarse, por ejemplo para factores de coagulación acoplados a polímero porque estos, en un plasma comercialmente disponible con deficiencia en el factor de coagulación correspondiente (por ejemplo abnormal plasma, American Diagnostica Inc.), o influyen en el tiempo de protrombina prolongado mediante esta deficiencia en el factor del plasma con deficiencia, mientras que la adición de una peptidasa no modificada del sistema de coagulación, lleva a un acortamiento hasta una normalización del tiempo de protrombina del plasma. También con ayuda de ensayos de coagulación conocidos en la especialidad puede comprobarse que las peptidasas acopladas a polímero no provocan reducción alguna del tiempo de coagulación como signo de un efecto de coagulación en muestras de plasma.

Por ejemplo, mediante el acoplamiento a polímero puede suprimirse o limitarse significativamente la capacidad de reacción de una peptidasa con sustancias macromoleculares del sistema hemostático con una masa molecular de 30.000 Da y superior.

De esta manera, mediante el acoplamiento a polímero, no se pierde solamente la capacidad de la peptidasa de reaccionar de manera activante con componentes de reacción de la cascada de coagulación, sino que, así mismo, ya no pueden inhibirse por inhibidores fisiológicos, tales como por ejemplo antitrombina con una masa molecular de 58.000 Da (en particular para PEG-Xa, PEG-IIa) o inhibidor de la ruta de factor tisular con una masa molecular de 39.000 Da (en particular para factor Xa).

Por el contrario, mediante el acoplamiento con el polímero, no se perjudica la capacidad de la peptidasa de reaccionar con sustratos de bajo peso molecular o inhibidores de bajo peso molecular de la peptidasa del sistema hemostático. La reacción con un inhibidor de la peptidasa lleva, en este contexto, a una inhibición de la actividad de la peptidasa acoplada a polímero. En función de la relación de concentración entre peptidasa e inhibidor, puede tratarse a este respecto de una inhibición parcial o completa. A este respecto, el término de la actividad de la peptidasa acoplada a polímero designa, en particular su capacidad de convertir enzimáticamente sustratos. Dado que, tal como se describió anteriormente, la capacidad de reacción de la peptidasa con sustratos macromoleculares ya no se da por el acoplamiento con el polímero, se trata por regla general de la capacidad de convertir enzimáticamente sustratos de bajo peso molecular. Se divulga un sustrato que presenta una masa molecular de al menos 100 Da y como máximo 10.000 Da. Se divulga así mismo que la masa molecular del sustrato asciende como máximo a 7.500 Da, en particular como máximo 5.000 Da o como máximo 2.500 Da.

Los inhibidores de peptidasas del sistema hemostático que, en el contexto de la invención muestran efecto también como inhibidores de las peptidasas acopladas a polímero, son habitualmente inhibidores de interacción directa o de unión directa o sustancias inhibitoras de la coagulación de unión directa, en particular aquellos, que se emplean como fármacos para este fin.

Por regla general, en el caso de los inhibidores del sistema hemostático, que reaccionan con las peptidasas acopladas a polímero o se neutralizan por las mismas, se trata de inhibidores de bajo peso molecular. Se divulga un inhibidor que presenta una masa molecular de al menos 100 Da y como máximo 10.000 Da. Se divulga así mismo que la masa molecular del inhibidor asciende como máximo a 7.500 Da, en particular como máximo 5.000 Da o como máximo 2.500 Da. Ejemplos de inhibidores de este tipo son principios activos, seleccionados del grupo de los principios activos de los fármacos para la inhibición directa del factor de coagulación Xa tales como rivaroxaban, apixaban, betrixaban, otamixaban, edoxaban, raxazaban, eribaxaban, YM150, LY-517717 o PRT054021 o para la inhibición directa de trombina, tales como dabigatran, argatroban, flovagatran, AZD0837, MCC-977, NU172 o bivalirudina. Como principios activos para la inhibición directa o inhibidores directos se designan a este respecto aquellas sustancias que ejercen su actividad inhibitora a través de una interacción directa con el factor de coagulación, es decir, normalmente una unión al factor de coagulación correspondiente.

En una forma de realización especialmente preferida para la provisión de una peptidasa acoplada a polímero, tiene lugar un acoplamiento de la peptidasa a PEG se acuerdo con los procedimientos en sí conocidos. En este sentido

pueden usarse derivados de PEG reactivos tales como ejemplo succinimidilsuccinato, succinimidilpropionato, nitrofenilcarbonato, tresilato, epóxidos, aldehídos, isocianatos, maleimidias y similares (Veronese FM, Pasut G: PEGylation, successful approach to drug delivery. DDT 2005; 10:1451-1458).

5 El número de cadenas que van a acoplarse así como su longitud puede configurarse aleatoriamente y adaptarse para la estructura de enzima respectiva, prefiriéndose masas moleculares medias de las cadenas de PEG tal como están indicadas en general anteriormente. Para eliminar por completo la capacidad de reacción de peptidasas con constituyentes del sistema de coagulación, se usan preferentemente para el acoplamiento moléculas de PEG de al menos 5 000 Da.

10 De esta manera puede acoplarse por ejemplo el factor Xa al PEG de tal manera que el PEG-Xa generado ya no pueda interactuar con el complejo de protrombinasa (cofactor Va, fosfolípido) y escindir la proenzima protrombina para dar la trombina activa, la enzima esencial para desencadenar la coagulación al final de la cascada de coagulación. PEG-Xa pierde a este respecto así mismo su capacidad de reaccionar con los inhibidores macromoleculares fisiológicos de factor Xa tales como antitrombina o TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*).

15 Por el contrario, tras el acoplamiento de PEG al factor Xa se mantiene sorprendentemente la capacidad de reacción original de factor Xa con las sustancias inhibitoras de bajo peso molecular usadas, entre otros, como principios activos farmacéuticos, al igual que la capacidad de reacción con sustratos peptídicos de bajo peso molecular.

20 Una forma de realización de la invención, en la que se emplean las peptidasas acopladas a polímero descritas en el presente documento, es un procedimiento para la detección o determinación cuantitativa de un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático en una muestra, siendo la peptidasa del sistema hemostático un factor de coagulación, seleccionado del grupo que consiste en factor IIa (trombina), VIIa, IXa, Xa, XIa así como fragmentos y mutantes de las peptidasas mencionadas, que muestran al menos el 80% de la capacidad de las peptidasas mencionadas de convertir enzimáticamente sus sustratos del sistema de coagulación y la muestra se selecciona de sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor u otro fluido, que comprende la puesta en contacto del inhibidor en la muestra con la peptidasa acoplada a un polímero del sistema hemostático, y el polímero es un polialquilenglicol o un copolímero, que comprende unidades de alquilenglicol, y en el que la peptidasa del sistema hemostático, por el acoplamiento a polímero, pierde su capacidad de reacción en el sistema de coagulación, pero, al mismo tiempo puede neutralizar aún inhibidores del sistema de coagulación con una masa molecular entre 100 y 2.500 Da y puede convertir enzimáticamente sustratos del sistema de coagulación con una masa molecular entre 100 y 2.500 Da, y o bien

30 (i) la medición de la actividad de la peptidasa acoplada a polímero tras su puesta en contacto con el inhibidor en la muestra, y la comparación de la actividad de la peptidasa acoplada tras la puesta en contacto con la muestra con uno o varios valores de referencia, para establecer una eventual inhibición de la actividad; o

35 (ii) la medición del tiempo de coagulación de la muestra tras la puesta en contacto con la peptidasa acoplada, y la comparación del tiempo de coagulación con uno o varios valores de referencia, para establecer una eventual variación del tiempo de coagulación. Un cambio de este tipo se desencadena mediante una reacción del inhibidor con la peptidasa acoplada, lo que lleva a una inhibición de la actividad del inhibidor.

40 Este procedimiento es adecuado particular para la detección o determinación cuantitativa de un inhibidor de bajo peso molecular. Se divulga a su vez un inhibidor que presenta una masa molecular de al menos 100 Da y como máximo 10.000 Da. Se divulga igualmente que la masa molecular del inhibidor asciende como máximo a 7.500 Da, en particular como máximo 5.000 Da o como máximo 2.500 Da. Ejemplos de inhibidores de este tipo son tal como se mencionó anteriormente. Deberá estar claro para el experto que habitualmente la peptidasa acoplada a polímero empleada en el procedimiento deberá adaptarse al inhibidor que va a detectarse o que va a determinarse cuantitativamente, es decir, deberá seleccionarse una peptidasa que pueda en principio realizar una interacción con el inhibidor. Para la detección o determinación cuantitativa de un inhibidor de bajo peso molecular en el contexto de la invención se empleará preferentemente una peptidasa acoplada a polímero, sobre la que actúa el inhibidor como inhibidor directo.

45 En particular, el procedimiento para la detección o determinación cuantitativa puede comprender las siguientes etapas preliminares:

50 (a) proporcionar al menos una muestra, en la que estará presente un inhibidor; y
(b) poner en contacto al menos una muestra de (a) con una peptidasa acoplada a polímero tal como se describe en el presente documento.

55 A este respecto, puede recurrirse a las muestras obtenidas en la etapa (a), de manera correspondiente al procedimiento (ii), para la detección o determinación cuantitativa del inhibidor no solo como muestra de medición en la etapa (b), sino también como muestras comparativas, por ejemplo para la medición de un tiempo de coagulación sin adición de la peptidasa acoplada a PEG.

La puesta en contacto de la peptidasa acoplada con el inhibidor en el procedimiento de acuerdo con la invención comprende preferentemente una incubación de la muestra con la peptidasa acoplada, en particular en la etapa (b), durante la cual puede tener lugar una interacción de un inhibidor opcionalmente presente en la muestra con la

peptidasa acoplada.

Se divulga que en el caso de la muestra se trata de una muestra que comprende un líquido o que es un líquido. Con frecuencia se trata de una muestra biológica, por ejemplo un fluido corporal, tal como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina o sudor, preferentemente sangre o plasma. En el caso de la muestra puede tratarse por ejemplo

5 de una muestra para un procedimiento de medición o de diagnóstico.

Según la opción (i) del procedimiento mencionado anteriormente, puede generarse por ejemplo un valor de referencia para la comparación, midiéndose la actividad de la peptidasa acoplada a polímero sin contacto previo con un inhibidor. Una reducción de la actividad de la peptidasa acoplada, después de que esta ha reaccionado con un inhibidor en la muestra, en comparación con un valor de referencia de este tipo, permite por ejemplo la conclusión de que el inhibidor

10 estaba presente en la muestra. Según la opción (i) pueden generarse también varios valores de referencia para la comparación, midiéndose la actividad de la peptidasa acoplada tras el contacto con diferentes concentraciones conocidas de un inhibidor. Así, por ejemplo la comparación con los valores de referencia, permite una determinación cuantitativa del inhibidor.

La medición de la actividad de la peptidasa acoplada a polímero, tanto antes de la puesta en contacto con la muestra para generar uno o varios valores de referencia como después de la puesta en contacto con la muestra para generar el valor de referencia, da información sobre la presencia o la concentración del inhibidor en la muestra, puede tener lugar de acuerdo con procedimientos convencionales. A este respecto, se determina en particular la capacidad de la peptidasa acoplada a polímero de convertir enzimáticamente sustratos. Dado que, tal como se describió anteriormente, la capacidad de reacción de la peptidasa con sustratos macromoleculares ya no se da por el

15 acoplamiento con el polímero, se trata por regla general de la capacidad de convertir enzimáticamente sustratos de bajo peso molecular. A este respecto se divulga un sustrato que presenta una masa molecular de al menos 100 Da y como máximo 10.000 Da. Se divulga así mismo que la masa molecular del sustrato asciende como máximo a 7.500 Da, en particular como máximo 5.000 Da o como máximo 2.500 Da. Por ejemplo pueden emplearse sustratos conocidos, de los que la peptidasa puede escindir un grupo de señalización, tal como por ejemplo un sustrato cromogénico. Como ejemplos de sustratos cromogénicos comercialmente disponibles adecuados para peptidasas

20 puede mencionarse para el factor Xa N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (por ejemplo S-2765TM, Chromogenix Instrumentation Laboratory, Milán, Italia), y para trombina puede mencionarse H-D-Phe-Pip- Arg-pNA (S-2238TM, Chromogenix Instrumentation Laboratory, Milán, Italia), como alternativa pueden usarse por ejemplo también sustratos fluorogénicos, luminogénicos o electroquímicos junto con la técnica de detección correspondiente.

Según la opción (ii), el inhibidor puede determinarse en la muestra a través de la medición del tiempo de coagulación. Para ello se encuentran disponibles diferentes posibilidades. Para una detección es suficiente por regla general comprobar que el tiempo de coagulación de una muestra, que se puso en contacto con la peptidasa acoplada a polímero, se ha reducido con respecto al tiempo de coagulación de una muestra correspondiente sin contacto con la peptidasa acoplada (valor de referencia) mediante una neutralización completa o proporcional del inhibidor.

Para una determinación cuantitativa puede recurrirse a una comparación correspondiente de dos muestras o grupos de muestras, de los que en uno se neutralizó el inhibidor mediante adición de la peptidasa acoplada. El cambio observado del tiempo de coagulación en las muestras neutralizadas con respecto a las no neutralizadas puede relacionarse a continuación, por ejemplo, con ayuda de una curva de calibración con los cambios que se provocan mediante concentraciones conocidas de inhibidores. En una forma de realización específica de la opción (ii), mediante

35 la adición de una cantidad definida de la peptidasa acoplada, puede neutralizarse proporcionalmente el inhibidor contenido en la muestra. Si se añade a esta muestra ahora un activador de coagulación, tal como por ejemplo tromboplastina, tromboplastina parcial, veneno de serpiente que activa la coagulación o una proteasa que activa la coagulación aislada a partir del mismo o un factor de coagulación activado que, en la cascada de activación, se encuentra antes de la enzima inhibida, se prolonga el tiempo de coagulación mediante la concentración residual del

40 inhibidor en comparación con una muestra correspondiente sin inhibidor. Si se comparan estos valores con el tiempo de coagulación que se midió en el mismo material de muestra sin adición de la peptidasa acoplada así como con la adición de concentraciones conocidas de un calibrador adecuado, puede determinarse con el uso de una calibración adecuada la concentración del inhibidor excluyendo la influencia de la composición de la muestra.

Si el material de muestra, debido a su composición, no puede coagular, puede añadirse, para la medición de la coagulación de la opción (ii) por ejemplo plasma normal como fuente para otros factores de coagulación o en particular fibrinógeno, mediante lo cual se mejora aún la especificidad del procedimiento.

En el caso del procedimiento de la primera forma de realización puede tratarse por ejemplo de un procedimiento de diagnóstico *in vitro*, en particular para la detección o para la medición cuantitativa de un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático en una muestra biológica, tal como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina o sudor.

55 El procedimiento puede emplearse por ejemplo también en procedimientos de selección en la búsqueda de principios activos.

La muestra puede, por ejemplo en el contexto de un procedimiento de diagnóstico *in vitro*, proceder en particular de un mamífero, tal como por ejemplo un ser humano.

En una forma de realización de especialmente preferida para la detección o determinación cuantitativa de un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático se permite una detección específica de fármacos que inhiben la coagulación, cuyo principio activo es un inhibidor directo del factor Xa, en fluidos corporales tales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor u otros fluidos. Debido a la especificidad del factor Xa acoplado a polímero, en particular de factor Xa acoplado a PEG (en adelante también "polímero-Xa" o "PEG-Xa") para inhibidores directos de factor Xa, este procedimiento de acuerdo con la invención permite una declaración exacta con respecto a la concentración de principio activo, sin que el resultado se falsee por la influencia del estado funcional actual del sistema de coagulación. Así mismos sin influencia son inhibidores indirectos de factor Xa, que actúan por ejemplo a través de antitrombina, tales como heparinas no fraccionadas o de bajo peso molecular, Orgaran o pentasacáridos tales como Fondaparinux. Este aspecto es en este sentido una ventaja, dado que con frecuencia los pacientes se cambian de las heparinas a anticoagulantes directos parenterales u orales y, por lo tanto, en un tiempo de transición, ambas clases de principio activo están presentes en la sangre. Estas se consideran conjuntamente por lo tanto en los métodos de determinación hasta el momento en mayor o menor medida.

Para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención preferido, se mezcla una muestra, por ejemplo plasma, que contiene un inhibidor de factor Xa de acción directa, con una cantidad definida de Xa acoplado a polímero, en particular PEG-Xa, y se incuba a lo largo de un periodo de tiempo adecuado. El polímero-Xa o PEG-Xa se une al inhibidor y se inactiva proporcionalmente a este respecto. Entonces se añade un sustrato, del que el polímero-Xa no activado o PEG-Xa puede escindir un grupo de señalización, tal como por ejemplo un sustrato cromogénico.

La actividad residual de polímero-Xa o PEG-Xa que se correlaciona inversamente con la concentración del inhibidor escinde el sustrato cromogénico. La formación de color resultante de esto se mide con un procedimiento adecuado. Mediante el uso de una calibración correspondiente puede medirse la concentración del inhibidor en la muestra exactamente y sin influencia de la composición de la muestra, en particular también en presencia de sustancias inhibitoras de acción indirecta, tales como heparinas. Además de sustratos cromogénicos en particular de bajo peso molecular pueden usarse por ejemplo también sustratos fluorogénicos, luminogénicos o electroquímicos de bajo peso molecular junto con la técnica de detección correspondiente.

El fundamento del procedimiento para la modificación de la especificidad de peptidasas del sistema hemostático mediante acoplamiento a polímeros tales como polietilenglicol, puede mostrarse también en el ejemplo de la trombina (a continuación también polímero-trombina o PEG-trombina). En su forma acoplada a polímero, en particular mediante acoplamiento con PEG, la trombina pierde su capacidad de interaccionar con constituyentes del sistema de coagulación y con ello su función en el sistema de coagulación. Ya no puede escindir el fibrinógeno para dar fibrina y por lo tanto desencadenar la coagulación en una muestra de plasma o sangre. polímero-trombina, en particular PEG-trombina, no puede reaccionar ni con otros constituyentes del sistema de coagulación plasmático y celular ni con inhibidores fisiológicos tales como antitrombina, cofactor de heparina II o $\alpha 2$ -macroglobulina.

Por el contrario, en el caso del polímero-trombina, en particular PEG-trombina, está conservada la capacidad de reacción con inhibidores de trombina de bajo peso molecular de acción directa con un peso molecular preferido de al menos 100 Da y como máximo 7.500 Da, al igual que la capacidad de reacción con sustratos peptídicos de bajo peso molecular con pesos moleculares correspondientes.

Por consiguiente, puede llevarse a cabo de manera correspondiente al procedimiento de acuerdo con la invención para la medición de sustancias inhibitoras de factor Xa por ejemplo también un procedimiento para la medición de sustancias inhibitoras de trombina de bajo peso molecular de acción directa. polímero-trombina, en particular PEG-trombina, se une en este sentido al inhibidor contenido en la muestra y se activa proporcionalmente de este modo. Su actividad residual, que está inversamente relacionada con la concentración del inhibidor en la muestra, se mide con sustratos de bajo peso molecular adecuados, por ejemplo mediante la determinación de la intensidad de color tras la reacción con un sustrato cromogénico. Mediante el uso de una calibración correspondiente puede determinarse la concentración del inhibidor.

Debido a las propiedades de las peptidasas acopladas a polímero, en particular acopladas a PEG pueden establecerse también procedimientos preferidos para la medición de la concentración de sustancias inhibitoras de acción directa de factor Xa y trombina, que como se describió anteriormente, se basan en una medición del tiempo de coagulación. Para ello se neutraliza proporcionalmente, mediante la adición de una cantidad definida de la PEG-peptidasa de la sustancia inhibidora contenida en la muestra. Si en esta muestra, ahora mediante la adición de activadores de coagulación adecuados, tal como por ejemplo tromboplastina, tromboplastina parcial, se añade veneno de serpiente de activación de la coagulación o una proteasa de activación de la coagulación aislada a partir de la misma o mediante adición de un factor de coagulación activado que en la cascada de activación se encuentra delante de la peptidasa inhibida, se prolonga el tiempo de coagulación mediante la concentración residual del principio activo. Si se comparan estos valores con el tiempo de coagulación que se midió en el mismo material de muestra sin adición de la PEG-enzima así como con la adición de concentraciones conocidas de un calibrador adecuado, puede determinarse la concentración de la sustancia inhibidora de la coagulación excluyendo la influencia de la composición de la muestra. Si el material de muestra, debido a su composición, no puede coagular, puede añadirse plasma normal como fuente para otros factores de coagulación y en particular fibrinógeno, mediante lo cual se mejora aún la especificidad del procedimiento.

Procedimientos según estos principios son, en principio, posibles además de factor Xa y trombina también para otras peptidasas del sistema hemostático o sus inhibidores, tales como por ejemplo para los factores IXa, XIa y VIIa.

Además se divulgan también dispositivos, fármacos y procedimientos para la neutralización de inhibidores de peptidasas del sistema hemostático, debiendo entenderse el término de la neutralización de modo que el inhibidor se une mediante una reacción con la peptidasa acoplada de acuerdo con la invención y así ya no puede mostrarse una actividad inhibidora adicional en una muestra o en un organismo.

Por la presente invención está comprendido un procedimiento *in vitro* para la neutralización de la actividad inhibidora de un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático con una masa molecular entre 100 y 2.500 Da, seleccionándose la peptidasa del grupo que consiste en factor IIa (trombina), VIIa, IXa, Xa, XIa así como fragmentos y mutantes de las peptidasas mencionadas, que muestran al menos el 80% de la capacidad de las peptidasas mencionadas, de convertir enzimáticamente sus sustratos del sistema de coagulación, que comprende la puesta en contacto de una muestra seleccionada de sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor u otro fluido, en la que está contenido el inhibidor, con una peptidasa acoplada a polímero del sistema hemostático, y en el caso del polímero se trata de polialquilenglicol o un copolímero, que comprende unidades de alquilenglicol, y en el que la peptidasa, por el acoplamiento a polímero, pierde su capacidad de reacción en el sistema de coagulación, pero, al mismo tiempo puede neutralizar aún inhibidores del sistema de coagulación con una masa molecular entre 100 y 2.500 Da y puede convertir enzimáticamente sustratos del sistema de coagulación con una masa molecular entre 100 y 2.500 Da, y la unión del inhibidor mediante reacción con la peptidasa acoplada a polímero.

Como prueba se divulga una muestra, que comprende un líquido o que es un líquido. Con frecuencia se trata de una muestra biológica, por ejemplo un fluido corporal, tal como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina o sudor, preferentemente sangre o plasma. En una forma de realización preferida, este procedimiento se emplea en el contexto de un diagnóstico *in vitro*, en el que se extrae una muestra de un mamífero, en particular un ser humano pero no se devuelve.

En una forma de realización se extrae la muestra de la sangre de un paciente que se trata o se trató con un fármaco que contiene un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático como principio activo. Tras la puesta en contacto de la muestra con la peptidasa acoplada se une el inhibidor administrado con el fármaco mediante la peptidasa y por lo tanto se neutraliza. En el contexto del procedimiento pueden llevarse a cabo por lo tanto adicionalmente tras la neutralización del inhibidor, pruebas para el diagnóstico de trastornos en el sistema hemostático o para la actividad de sustancias que intervienen en el sistema hemostático de manera ventajosa en la muestra.

En el caso de pacientes que se tratan con inhibidores que inhiben la coagulación de acción directa, la presencia de estos inhibidores en la sangre o el plasma provoca que determinados métodos de laboratorio *in vitro* para el diagnóstico del estado funcional del sistema hemostático o para la determinación de la actividad de sustancias que intervienen en el sistema hemostático, están considerablemente alterado y por lo tanto ya no son significativos. Esto se refiere en particular a métodos que se basan en la medición del tiempo de coagulación desde el momento de la adición de activadores especiales hasta el comienzo del acontecimiento de coagulación (por ejemplo aPTT, PT, TT, determinación del fibrinógeno). Bajo la influencia de los principios activos farmacéuticos se retarda claramente de manera artificial el tiempo de coagulación en estas pruebas pero ya mediante estos principios activos y ya no permite ninguna deducción diagnóstica con respecto al estado del sistema hemostático. En particular ya no puede diagnosticarse ninguna carencia de factores de coagulación, lo que es desventajoso en distintas situaciones clínicas. Mediante la neutralización de los inhibidores, estas pruebas pueden llevarse a cabo sin influencia mediante el inhibidor y mantienen su fuerza informativa diagnóstica completa.

También para esta forma de realización se divulgan inhibidores que presentan una masa molecular de al menos 100 Da y como máximo 10.000 Da. Se divulga así mismo que la masa molecular del inhibidor asciende como máximo a 7.500 Da, en particular como máximo 5.000 Da o como máximo 2.500 Da. Ejemplos de inhibidores de este tipo son tal como se mencionó anteriormente. Para la neutralización del inhibidor en el contexto de la invención se empleará de manera ventajosa una peptidasa acoplada a polímero, sobre la que actúa el inhibidor como inhibidor directo.

Se divulga también un dispositivo que contiene una peptidasa acoplada a polímero de acuerdo con la invención del sistema hemostático, para eliminar un inhibidor de una peptidasa del sistema de coagulación sanguínea de una muestra o de la circulación sanguínea de un paciente. A este respecto, la peptidasa acoplada a polímero puede estar inmovilizada por ejemplo sobre un material de soporte. En este contexto se hace referencia a modo de ejemplo al documento WO 98/46648, que divulga procedimientos y sistemas de interacción, con cuya ayuda pueden inmovilizarse sobre un material de soporte las peptidasas acopladas a polímero, en particular polialquilenglicol o peptidasas acopladas a PEG. La inmovilización de la peptidasa acoplada a polímero puede tener lugar por ejemplo sobre estructuras particuladas, capilares, estructuras de red o paredes de recipientes. La peptidasa acoplada inmovilizada puede encontrarse en particular en un recipiente, tal como un cartucho, que presenta una entrada y una salida para fluidos y que puede atravesarse por un fluido.

Son especialmente adecuadas aquellas formas del dispositivo que pueden conectarse de manera extracorpórea en la circulación sanguínea de un paciente. Para ello puede conducirse por ejemplo sangre por medio de un sistema de tubo flexible con o sin bomba del organismo de manera extracorpórea mediante un cartucho que está cargado con un

material adecuado tal como por ejemplo capilares, partículas o similares, en cuya superficie está inmovilizada la peptidasa acoplada a polímero. Si la sangre o también el plasma, cuando se efectuó previamente una separación celular, circula pasando por la peptidasa acoplada a polímero fijada en la superficie, esta se une específicamente al inhibidor contenido, que se retira de esta manera de la circulación, lo que lleva a una disminución de la concentración sanguínea hasta intervalos no tóxicos.

Se divulga también una peptidasa acoplada a polímero del sistema hemostático para su uso en el restablecimiento de la capacidad de coagulación de la sangre, para aumentar la tendencia a la coagulación de la sangre y/o para acelerar la coagulación sanguínea.

Un uso de este tipo puede estar indicado en particular en pacientes que se sometieron o se someten a un tratamiento con una sustancia inhibidora de bajo peso molecular. A este respecto se prefiere a su vez un inhibidor que presenta una masa molecular de al menos 100 Da y como máximo 10.000 Da. Preferentemente la masa molecular del inhibidor asciende como máximo a 7.500 Da, en particular como máximo 5.000 Da o como máximo 2.500 Da. Ejemplos de inhibidores de este tipo son principios activos, seleccionados del grupo de los principios activos de los fármacos para la inhibición directa de factor de coagulación Xa tal como por ejemplo rivaroxaban, apixaban, betrixaban, otamixaban, edoxaban, eribaxaban, YM150, LY- 517717 o PRT054021 o para la inhibición directa de trombina, tal como por ejemplo dabigatran, argatroban, flovagatran, AZD0837, MCC-977, NU172 o bivalirudina.

Las peptidasas acopladas a polímero para la neutralización de inhibidores, en particular sustancias inhibidoras de la coagulación de bajo peso molecular de acción directa pueden emplearse por ejemplo en pacientes, por ejemplo cuando la concentración sanguínea de estos principios activos se encuentra en intervalos que pueden llevar a hemorragias peligrosas, por ejemplo para permitir con ello una operación. Para ello puede administrarse la correspondiente peptidasa acoplada a polímero directamente en la circulación sanguínea del paciente. Esta reaccionará en la sangre de manera específica con la sustancia inhibidora de la coagulación y antagonizará con ello su efecto inhibidor de la coagulación, sin ejercer en sí un efecto propio. A diferencia de los mutantes de factores de coagulación, en este caso no hay que temer ninguna inmunización, dado que puede tratarse preferentemente de la forma natural de la proteína. El ejemplo de la hemofilia de cuerpos inhibidores muestra que incluso cambios mínimos de la estructura mediante mutaciones puntuales puede inducir ya una formación de anticuerpos clínicamente significativa. La peptidasa acoplada a polímero puede ponerse en contacto también en forma inmovilizada con la sangre de un paciente, en este sentido se remite al dispositivo divulgado anteriormente.

Se divulga también un kit de prueba que comprende como un primer reactivo una peptidasa acoplada a polímero del sistema hemostático y como un segundo reactivo un sustrato de la peptidasa, que puede emplearse en el procedimiento de diagnóstico descrito anteriormente.

En particular pueden emplearse en el kit sustratos conocidos, de los que la peptidasa acoplada a polímero puede escindir un grupo de señalización, tal como por ejemplo un sustrato cromogénico. Como alternativa pueden usarse por ejemplo también sustratos fluorogénicos, luminogénicos o electroquímicos. Debería ser comprensible que, para estos fines, debido a la modificación de la peptidasa, sean adecuados en particular sustratos de bajo peso molecular, preferentemente aquellos que presentan una masa molecular de al menos 100 Da y como máximo 10.000 Da. De manera especialmente preferente, la masa molecular asciende como máximo a 7.500 Da, en particular como máximo 5.000 Da o como máximo 2.500 Da.

Los siguientes ejemplos explicarán en detalle la invención sin limitarla a los mismos.

40 Producción de un conjugado de PEG-factor Xa

150 µg de factor Xa bovino (EC 3.4.21.6, American Diagnostica Inc.) disueltos en 300 µl de tampón fosfato 0,05 M, pH 8,0 se añadieron a 20 mg de metoxi-polietilenglicol (PEG)-20.000 succinimidilpropionato. La preparación se sacudió durante 1 h en el frigorífico (+2°C -+8°C). Tras 1 h se añadieron a la preparación otros 10 mg de metoxi-PEG-20,000 succinimidilpropionato y se sacudió la mezcla durante una hora más a +2°C -+8°C.

El conjugado de PEG 20 kD-factor Xa se aisló mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Hi Load Superdex 200 pg 16/60 con Tris/HCl 0,02 M, NaCl 0,1 M, pH 7,4 a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El conjugado PEG-factor Xa se eluye en primer lugar como pico simétrico con un volumen de elución de 40 ml (detección de la absorción UV a 220 nm y 280 nm). El exceso de polímero y los productos de reacción se eluyen posteriormente y se separaron de esta manera de la proteína conjugada.

Las fracciones que contienen proteína con actividad de factor Xa (determinada a través de la escisión de un sustrato cromogénico para factor Xa) se reunieron en tubos de recogida de fracciones, en los que se dispuso previamente PEG 8000 como estabilizador. Las fracciones con el contenido más alto en factor Xa se reunieron y se almacenaron en alícuotas a -80°C.

Ejemplo 2

55 Propiedades enzimáticas de PEG 20 kD-factor Xa

a) Escisión de sustrato cromogénico por PEG 20kD-factor Xa

La escisión del sustrato cromogénico N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (Haemochrom Diagnostica GmbH) se caracterizó a través de la determinación de la constante de Michaelis-Menten K_m del sustrato. Como K_m para PEG 20 kD-factor Xa se determinó 0,102 mM, la constante es por lo tanto idéntica a K_m para el factor Xa no modificado, que ascendía a 0,105 mM.

b) Inhibición de la actividad amidolítica de PEG 20 kD-factor Xa mediante el inhibidor directo de bajo peso molecular Pefabloc Xa

Para determinar la inhibición de la actividad amidolítica de PEG 20 kD-factor Xa por el inhibidor de bajo peso molecular Pefabloc Xa (Loxo GmbH), se empleó un ensayo cromogénico y la evaluación según Lineweaver-Burk. La constante de inhibidor K_i para Pefabloc Xa frente a PEG 20 kD-factor Xa ascendió a $0,7 \pm 0,13 \mu\text{M}$. Esta es comparable con la constante de inhibidor determinada con respecto a la enzima no modificada K_i de $1,1 \pm 0,07 \mu\text{M}$.

c) Influencia de antitrombina y heparina/antitrombina sobre la actividad amidolítica de PEG 20 kD-factor Xa

25 μl de factor Xa (American Diagnostica Inc., 1 mg/ml) o PEG 20 kD-factor Xa (1 mg de proteína/ml) se incubaron con 25 ml antitrombina III (50 unidades/ml, Sigma Chemical Co. A-7388) durante 2-20 min, la actividad amidolítica se determinó tras la adición de sustrato cromogénico. Mientras que la actividad de factor Xa en función del tiempo de incubación se inhibió en un 99%, la antitrombina III no tenía ninguna influencia inhibitoria sobre la actividad de PEG 20 kD-factor Xa (Figura 1).

25 μl de factor Xa (American Diagnostica Inc., 1 μg /ml) o PEG 20 kD-factor Xa (1 μg de proteína/ml) se incubaron con 25 μl de una mezcla de antitrombina III (10 unidades/ml, Sigma Chemical Co. A-7388) y heparina (2 unidades de anti-FXa/ml, Low molecular weight heparin, 2nd International Standard, NIBSC) durante 2-20 min, la actividad amidolítica se determinó tras la adición de sustrato cromogénico. Mientras que la actividad de factor Xa en función del tiempo de incubación se inhibió en un 99%, el complejo antitrombina III / heparina no tenían ninguna influencia inhibitoria sobre la actividad de PEG 20 kD-factor Xa (Figura 2).

d) Actividad de PEG 20 kD-factor Xa en el sistema de coagulación plasmático

Se determinó la actividad de coagulación de factor Xa no modificado (American Diagnostica Inc.), se incubaron 50 μl de plasma con 50 μl de factor Xa (contenido en proteína entre 0,015 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 1 min a 37°C, la reacción de coagulación se inició mediante la adición de solución 50 μl de CaCl_2 0,025 M, que se templó a 37°C. Los tiempos de coagulación se determinaron en un coagulómetro esférico KC4A Micro y se encontraban entre 178 s y 34 s.

Con el uso de PEG 20 kD-factor Xa en lugar del factor Xa no modificado en concentraciones comparables en el ensayo de coagulación no pudo desencadenarse una coagulación, todos los tiempos de coagulación medidos se encontraban en >250 s.

Para detectar que PEG 20 kD-factor Xa no ejerce actividad alguna en el sistema de coagulación, se llevaron a cabo además lo siguientes ensayos: A plasma con deficiencia en factores de coagulación (abnormal plasma, American Diagnostica Inc.) se le añadió factor Xa o PEG 20 kD-factor Xa (50 μl de plasma + 50 μl de factor Xa 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en BSA al 1,5%). Mediante la compensación de la deficiencia de factor Xa se redujo a 15,1 s el tiempo de protrombina con respecto a plasma normal (normal plasma, American Diagnostica Inc.) en el plasma deficiente en factores de, prologado de 12,2 s a 29,9 s. Tras la adición de pequeñas cantidades de PEG 20 kD-factor Xa no se redujo el tiempo de protrombina del plasma deficiente, el PEG 20 kD-factor Xa no mostró ninguna actividad en el sistema de coagulación plasmático (Figura 3).

Ejemplo 3

Determinación cuantitativa del inhibidor directo de factor Xa sintético de bajo peso molecular Pefabloc Xa en el plasma

Para la determinación cuantitativa del inhibidor directo de factor Xa sintético Pefabloc Xa (Loxo GmbH) en el plasma se incuban 25 μl de PEG 20 kD-factor Xa (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en Tris/HCl 0,02 M, NaCl 0,1 M, PEG 8.000 al 1,5%, pH 7,4 a TA), 25 μl de muestra de plasma (plasma de citrato) y 100 μl de tampón de reacción (Tris 0,05 M/HCl, NaCl 0,3 M, pH 8,4 a TA) 1 min a 37°C en el aparato de medición (TC4+, TECO GmbH). Tras la adición de 50 μl de sustrato cromogénico se registra el aumento de la densidad óptica a 405 nm (escisión del sustrato cromogénico y liberación p-nitroanilina mediante la parte no incubada del PEG 20 kD-factor Xa).

La actividad del PEG 20 kD-factor Xa se determina a través del aumento de la curva de reacción (cambio de la densidad óptica en mOD/min). La actividad disminuye proporcionalmente a la concentración de inhibidor en el plasma. Se registra una curva de calibración, determinándose la actividad de PEG 20 kD-factor Xa a concentraciones de inhibidor definidas (10 μM -100 μM) en el plasma recogido de citrato (Figura 4). Con ayuda de esta curva de calibración puede determinarse la concentración de inhibidor de una muestra de plasma desconocida a través de su actividad.

Ejemplo 4

Producción de un conjugado de PEG-factor IIa

5 mg de factor IIa bovino (trombina, EC 3.4.21.5, Kordia.) se disuelven junto con 100 mg de metoxi-polietilenglicol (PEG)-5.000 p-nitrofenilcarbonato en 500 µl de tampón fosfato 0,05 M, pH 8,0. La preparación se sacudió durante 2 h en el frigorífico (+2°C -+8°C). Tras 30 min y 60 min se añadieron a la preparación 45 mg adicionales y tras 90 min 6 mg adicionales de metoxi- polietilenglicol (PEG)-5.000 p-nitrofenilcarbonato.

El conjugado de PEG 5kD-trombina se eluyó mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Hi Load Superdex 200pg 16/60 con NaCl 0,1 M a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El conjugado PEG-trombina se eluye en primer lugar como pico simétrico con un volumen de elución de 55ml (detección de la absorción UV a 220 nm y 280 nm). El exceso de polímero y los productos de reacción se eluyen posteriormente y se separaron de esta manera de la proteína conjugada.

Las fracciones que contienen proteína se reunieron en tubos de recogida de fracciones, en los que se dispuso previamente PEG 8000 como estabilizador. Las fracciones con el mayor contenido en trombina (medido a través de la escisión de un sustrato de trombina cromogénico) se reunieron y se almacenaron en alícuotas a -20°C.

Ejemplo 5

Determinación cuantitativa del inhibidor directo de factor IIa sintético de bajo peso molecular. Argatroban en el plasma

Para la determinación cuantitativa del inhibidor directo de factor IIa sintético Argatroban (Mitsubishi Pharma) en el plasma se añaden 15 µl de muestra de plasma (plasma de citrato) a 50 µl de sustrato cromogénico (H-D-Chg-Ala-Arg-pNA, JenAffin GmbH, 3 mM en Tris/HCl 0,05M, NaCl 0,1 M, pH 8,0 a 37°C). La reacción cromogénica se inició mediante adición de 100 µl de PEG 5kD- trombina. En el aparato de medición (TC4+, TECO GmbH) se registra el aumento de la densidad óptica a 405 nm (escisión del sustrato cromogénico y liberación de p-nitroanilina mediante la parte no inhibida del PEG 5kD-trombina).

La actividad del PEG 5 kD-trombina se determina a través del aumento de la curva de reacción (cambio de la densidad óptica en mOD/min). La actividad disminuye proporcionalmente a la concentración de inhibidor en el plasma. Se registra una curva de calibración, determinándose la actividad del PEG 5kD-trombina a concentraciones de inhibidor definidas (0,375 µg/ml - 3 µg/ml) en plasma recogido de citrato (Figura 5). Con ayuda de esta curva de calibración puede determinarse la concentración de inhibidor de una muestra de plasma desconocida a través de su actividad.

Ejemplo 6

Influencia de heparina sobre la actividad amidolítica de PEG 5kD-trombina

La influencia de heparina (Sigma, H-3393) en plasma sobre la actividad amidolítica de PEG 5 kD-trombina se comparó con la influencia de heparina sobre la actividad amidolítica de trombina no modificada. Se empleó el ensayo cromogénico para la determinación de inhibidores directos de trombina (Ejemplo 5): Se añadieron 15 µl de muestra de plasma (plasma de citrato) a 50 µl de sustrato cromogénico (H-D-Chg-Ala-Arg-pNA, JenAffin GmbH, 3 mM en Tris 0,05 M/HCl, NaCl 0,1 M, pH 8,0 a 37°C). La reacción cromogénica se inicia mediante la adición de 100 µl de PEG 5kD-trombina o trombina. En el aparato de medición (TC4+, TECO GmbH) se registra el aumento de la densidad óptica a 405 nm (escisión del sustrato cromogénico y liberación de p-nitroanilina).

Se mostró que concentraciones de heparina crecientes en la muestra de plasma (heparina junto con plasma-antitrombina) influyen de manera inhibitoria en la actividad de trombina no modificada. El contenido en heparina de la muestra de plasma no tenía ninguna influencia sobre la actividad amidolítica del PEG 5 kD-trombina (Figura 6).

Figura 1: Influencia de la incubación de antitrombina III sobre la actividad de PEG 20 kD-factor Xa así como factor Xa no modificado

Figura 2: Influencia de la incubación de antitrombina III / heparina (bajo peso molecular) sobre la actividad de PEG 20 kD-factor Xa así como factor Xa no modificado

Figura 3: Influencia de la adición de PEG 20kD-factor Xa así como factor Xa no modificado sobre el tiempo de protrombina de plasma deficiente en factores

Figura 4: Curva de calibración para la determinación cuantitativa del inhibidor directo de factor Xa Pefabloc Xa en plasma por medio de ensayo cromogénico de PEG-factor Xa

Figura 5: Curva de calibración para la determinación cuantitativa del inhibidor directo de trombina Argatroban en plasma por medio de ensayo cromogénico de PEG-trombina

Figura 6: Influencia de la concentración de heparina en plasma sobre la actividad amidolítica de PEG 5 kD-trombina así como trombina no modificada

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección o la determinación cuantitativa de un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático en una muestra, siendo la peptidasa del sistema hemostático un factor de coagulación, seleccionado del grupo que consiste en factor IIa (trombina), VIIa, IXa, Xa, XIa así como fragmentos y mutantes de las peptidasas mencionadas, que muestran al menos el 80 % de la capacidad de las peptidasas mencionadas de convertir enzimáticamente sus sustratos del sistema de coagulación, y la muestra se selecciona de sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor u otro fluido, que comprende
- 5 la puesta en contacto del inhibidor en la muestra con la peptidasa acoplada a un polímero del sistema hemostático, y el polímero es un polialquilenglicol o un copolímero, que comprende unidades de alquilenglicol, y en el que la peptidasa del sistema hemostático, por el acoplamiento a polímero, pierde su capacidad de reacción en el sistema de coagulación, pero, al mismo tiempo puede neutralizar aún inhibidores del sistema de coagulación con una masa molecular de entre 100 y 2.500 Da y puede convertir enzimáticamente sustratos del sistema de coagulación con una masa molecular de entre 100 y 2.500 Da, y o bien
- 10 (i) la medición de la actividad de la peptidasa acoplada a polímero tras su puesta en contacto con el inhibidor en la muestra, y la comparación de la actividad de la peptidasa acoplada tras la puesta en contacto con la muestra con uno o varios valores de referencia, para establecer una eventual inhibición de la actividad; o
- 15 (ii) la medición del tiempo de coagulación de la muestra tras la puesta en contacto con la peptidasa acoplada, y la comparación del tiempo de coagulación con uno o varios valores de referencia, para establecer una eventual variación del tiempo de coagulación.
- 20 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, tratándose en el caso del inhibidor de un inhibidor de acción directa.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que en el caso del inhibidor se trata de un principio activo de las clases de los inhibidores directos de factor Xa o de los inhibidores directos de trombina.
4. Procedimiento *in vitro* para la neutralización de la actividad inhibitoria de un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático con una masa molecular de entre 100 y 2.500 Da, seleccionándose la peptidasa del grupo que consiste en factor IIa (trombina), VIIa, IXa, Xa, XIa así como fragmentos y mutantes de las peptidasas mencionadas, que muestran al menos el 80 % de la capacidad de las peptidasas mencionadas de convertir enzimáticamente sus sustratos del sistema de coagulación, que comprende
- 25 la puesta en contacto de una muestra seleccionada de sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor u otro fluido, en la que está contenido el inhibidor, con una peptidasa acoplada a polímero del sistema hemostático, y en el caso del polímero se trata de polialquilenglicol o un copolímero que comprende unidades de alquilenglicol, y en el que la peptidasa, por el acoplamiento a polímero, pierde su capacidad de reacción en el sistema de coagulación, pero, al mismo tiempo puede neutralizar aún inhibidores del sistema de coagulación con una masa molecular de entre 100 y 2.500 Da y puede convertir enzimáticamente sustratos del sistema de coagulación con una masa molecular de entre 100 y 2.500 Da, y la unión del inhibidor mediante reacción con la peptidasa acoplada a polímero.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la muestra se obtiene a partir de la sangre de un paciente que se trata o se trató con un fármaco que contiene un inhibidor de una peptidasa del sistema hemostático como principio activo y, en el que tras la puesta en contacto de la muestra con la peptidasa acoplada, se une el inhibidor administrado con el fármaco mediante la peptidasa y por lo tanto se neutraliza.
- 40 6. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en el que adicionalmente tras la neutralización del inhibidor se llevan a cabo pruebas en la muestra para el diagnóstico de trastornos en el sistema hemostático o para detectar la actividad de sustancias que intervienen en el sistema hemostático.

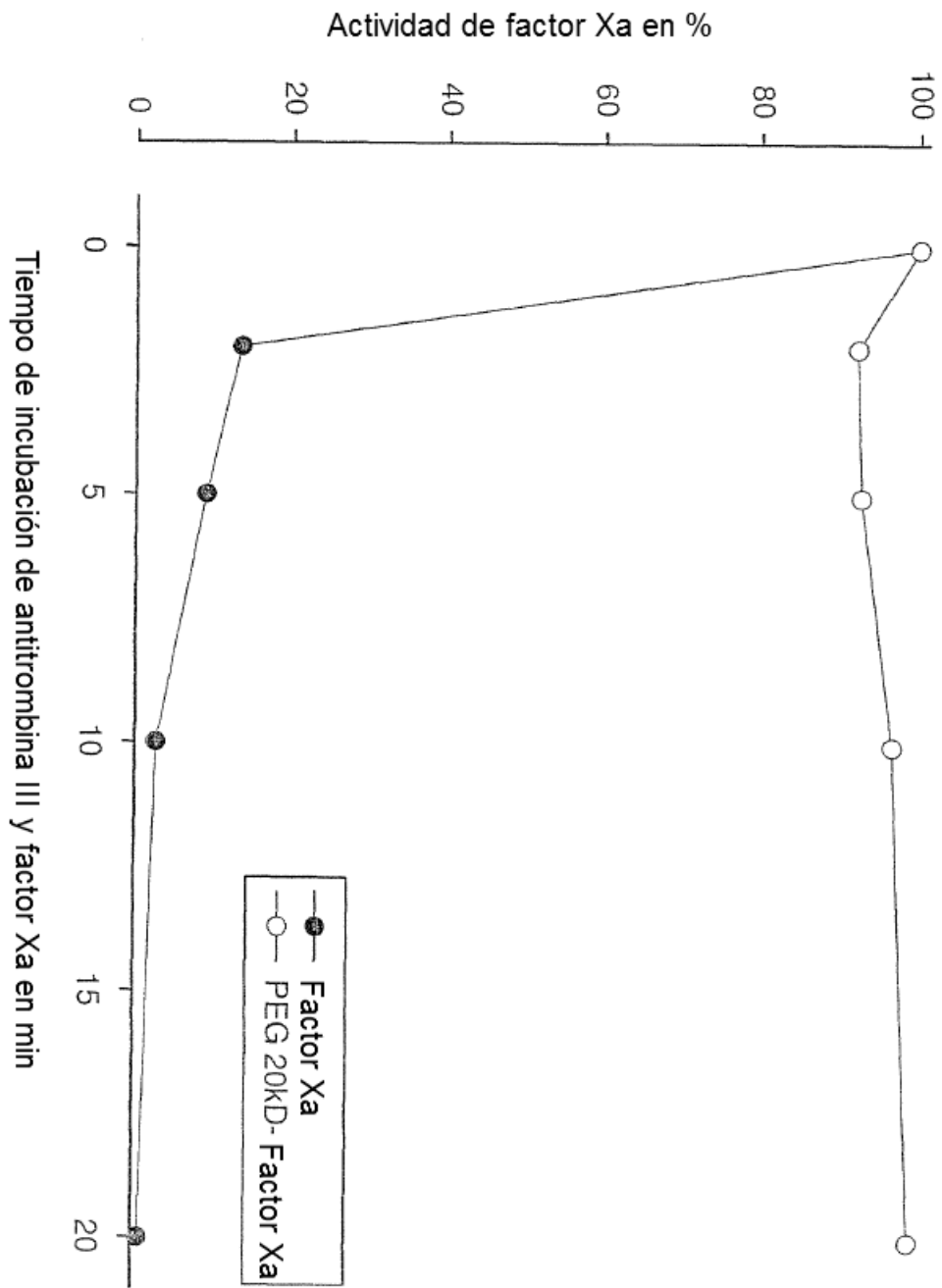


Fig. 1

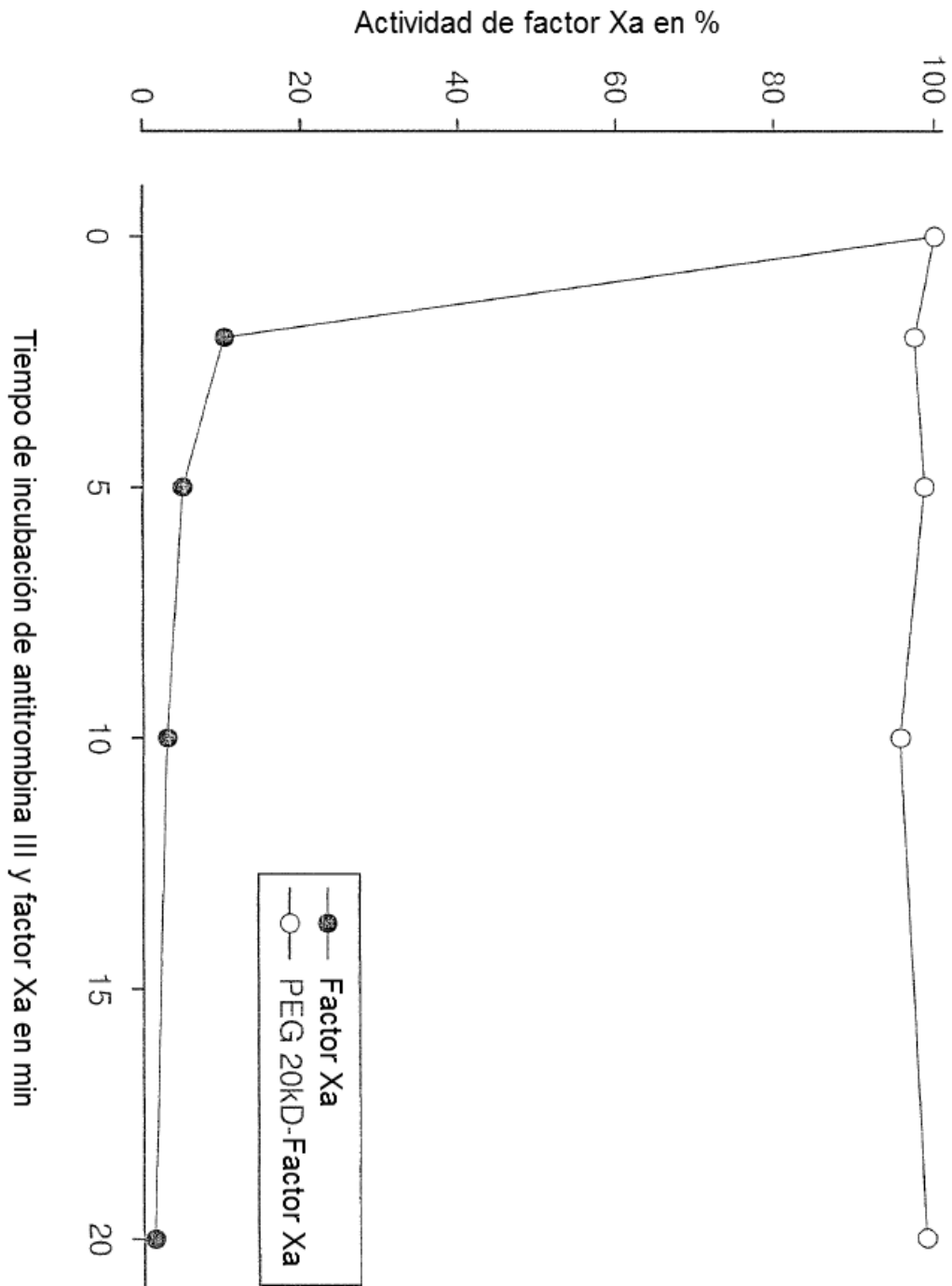


Fig. 2

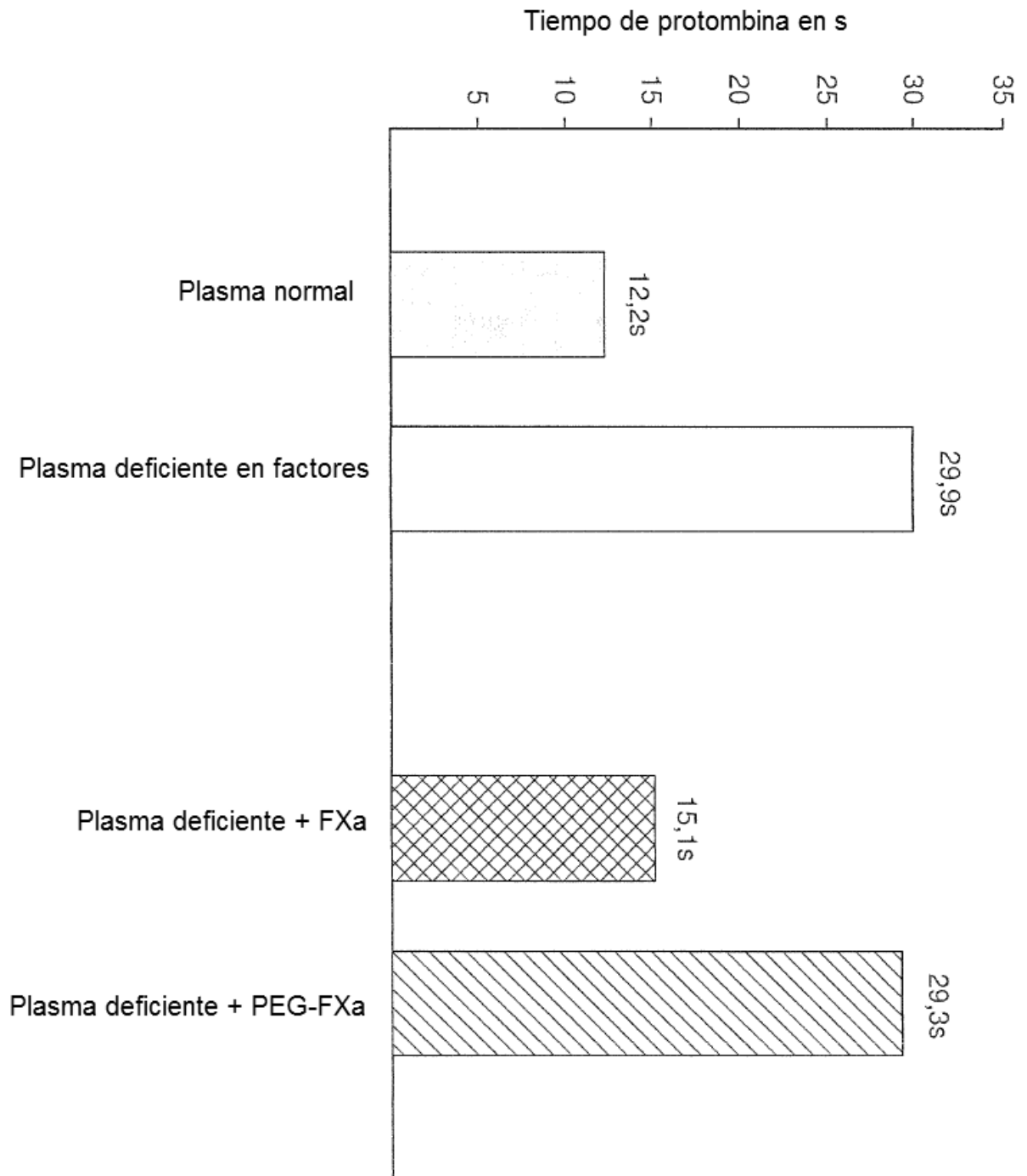


Fig. 3

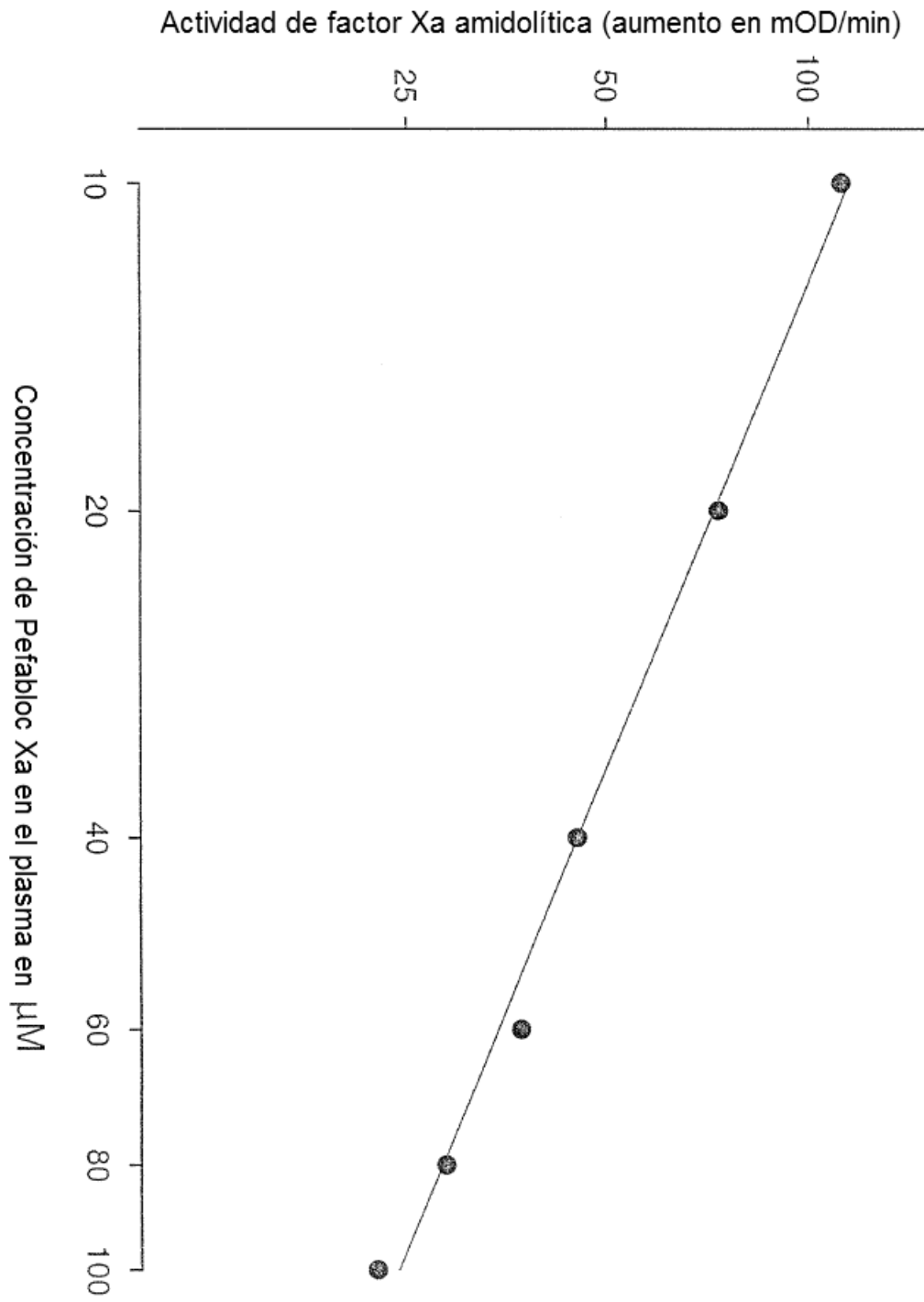


Fig. 4

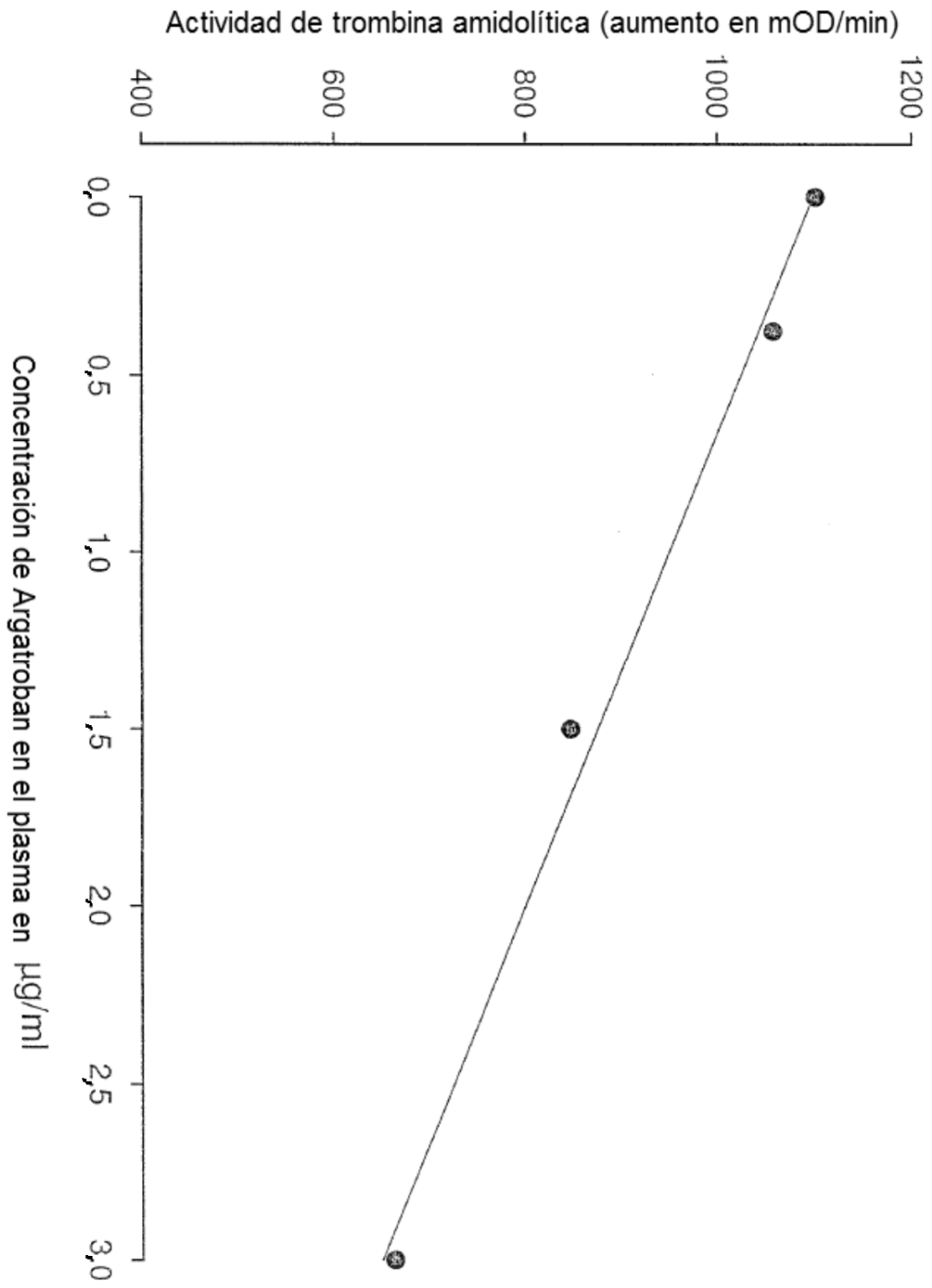


Fig. 5

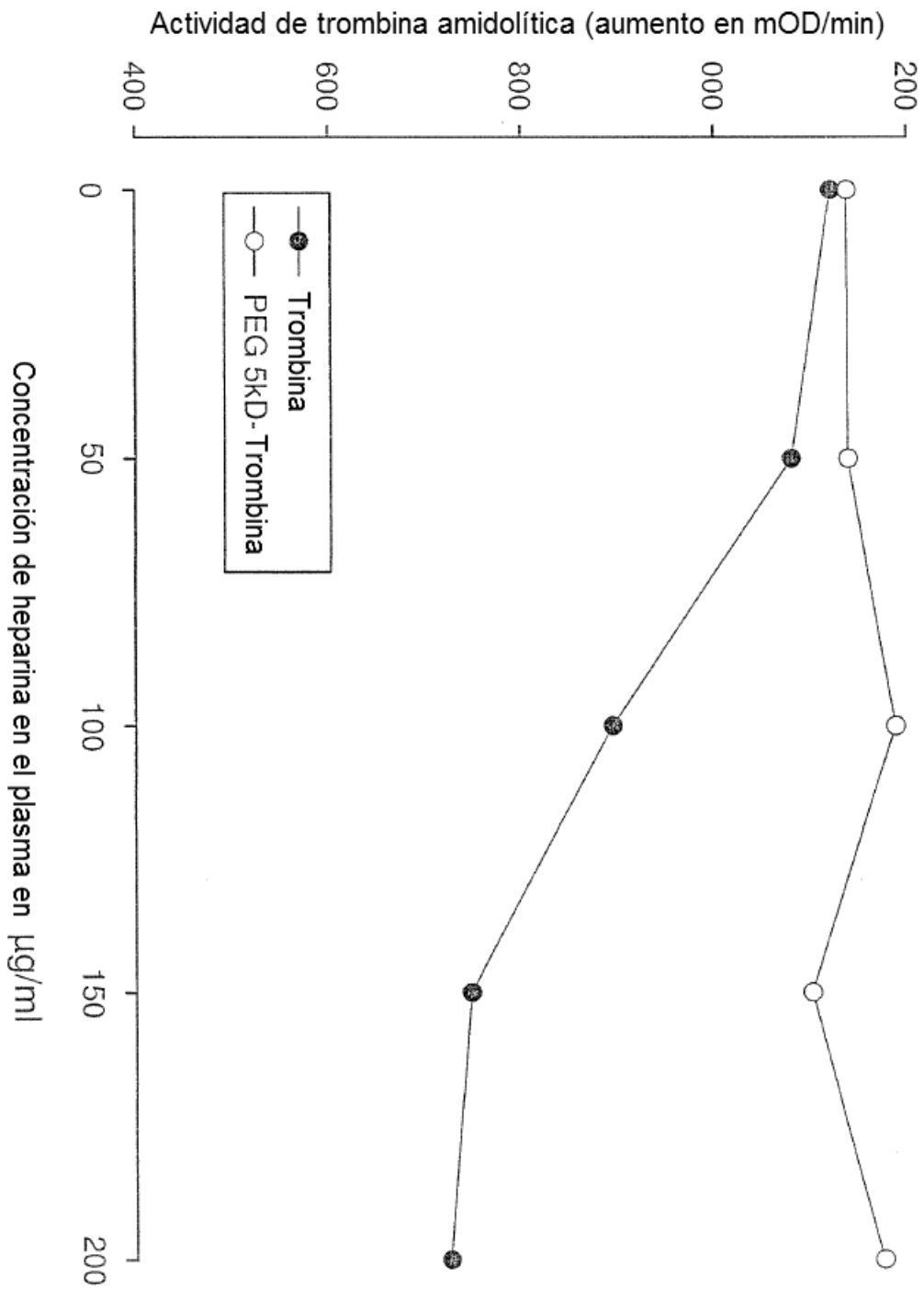


Fig. 6