

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 023**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/56** (2006.01)

**C12Q 1/66** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011 PCT/NL2011/050850**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12096566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11805664 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2652142**

54 Título: **Prueba de hemostasia basada en la quimioluminiscencia**

30 Prioridad:

**14.12.2010 NL 2005858**  
**14.12.2010 US 422751 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.07.2017**

73 Titular/es:

**STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT (50.0%)**  
**Geert Grooteplein-Zuid 10**  
**6525 GA Nijmegen, NL y**  
**CHIRALIX B.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VAN HEERDE, WAANDER LAURENS y**  
**BLAAUW, RICHARD HENDRIK**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 626 023 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

Prueba de hemostasia basada en la quimioluminiscencia

## 5 Campo de la invención

[0001] La presente invención pertenece al campo de la medicina, en particular al campo de la coagulación sanguínea. Más específicamente, la invención se refiere a un método nuevo para la medición directa de la generación de factores de la hemostasia utilizando un sustrato que produce una señal óptica cuando es activado por una coagulación de la sangre y/o factor fibrinolítico de interés. "Directo" en la frase precedente significa que no hay necesidad de transformar o adaptar la señal generada.

Antecedentes de la invención

15 [0002] El equilibrio hemostático depende de las interacciones entre las plaquetas, la coagulación en las paredes vasculares y la fibrinólisis. Cuando se produce una herida de la pared vascular, las plaquetas se adhieren al subendotelio y forman agregados. Después, se inicia la coagulación, dando como resultado la producción de fibras de fibrina que estabilizan el tapón plaquetario. Todas estas etapas son importantes para la formación un coágulo de sangre estable que es resistente contra las fuerzas reológicas del flujo sanguíneo. La trombina desempeña un papel clave en estos procesos, ya que es responsable de una variedad completa de reacciones, por ejemplo, solidifica la sangre mediante la formación de fibrina, activa las plaquetas, activa los mecanismos de retroalimentación positiva e interactúa con los receptores endoteliales para iniciar mecanismos de retroalimentación negativa. Las plaquetas activadas, a su vez, catalizan la formación de trombina. La trombina tiene una semivida corta, aproximadamente de unos pocos minutos, que es causada por la unión de inhibidores de la trombina, como la antitrombina. Las antitrombinas también actúan como proteínas reguladoras, que pueden inactivar las primeras trazas de trombina antes de poder aumentar la generación de trombina mediante reacciones de retroalimentación positiva. Esto evita la formación de coágulos sistémicos. La fibrinólisis, a su vez, solubiliza la fibrina que contiene el tapón plaquetario. El desequilibrio de este equilibrio hemostático en uno o más espacios (pared vascular, glóbulos rojos, coagulación y fibrinólisis) puede resultar en una respuesta trombótica o fenotipo hemorrágico que incluso puede llegar a ser mortal.

[0003] Cuando ocurren anomalías del sistema hemostático, es esencial diagnosticar, controlar y tratar al paciente para optimizar la intervención terapéutica.

35 [0004] Las pruebas de hemostasia conocidas implican ensayos según un criterio de valoración, que detectan el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo (ensayos de coagulación) o la lisis de coágulos en tiempo real mediante turbidimetría (ensayos de fibrinólisis). Aunque se llevan a cabo de manera rutinaria, los ensayos de coagulación disponibles actualmente tienen limitaciones inherentes que los hacen potencialmente poco fiables como herramientas para la supervisión de aumentos en la coagulación. Además, no siempre hay una buena correlación entre los resultados de las pruebas de coagulación y la prevención de hemorragias postoperatorias o trombosis recurrentes (Hemker et al. Curr. Opin. in Hematology 2004,11:170-175).

45 [0005] La mayor parte de las limitaciones se refieren al hecho de que éstas son pruebas según un criterio de valoración que miden el tiempo de formación de coágulos *in vitro* y requieren la adición de reactivos exógenos (tales como factor tisular, caolín e iones  $Ca^{2+}$  para reponer los limitados por un anticoagulante) y, por lo tanto, no reflejan necesariamente el potencial trombótico del paciente (potencial de coagulación).

50 [0006] En comparación con las pruebas anteriormente descritas, EP 420 332 divulga un ensayo de generación de trombina mejorado. En este ensayo no sólo se recopila información acerca de la coagulación del plasma, sino también acerca de la generación total de trombina después de la formación de coágulos. Estos ensayos se llevaron a cabo primero con sustratos cromogénicos y más adelante con sustratos fluorogénicos. Además, se describen diferentes ensayos de generación de trombina con plasma pobre en plaquetas y rico en plaquetas.

55 [0007] Los cromóforos (por ejemplo p-nitroanilina [p-NA ]) usados en ensayos cromogénicos típicamente se evalúan utilizando una longitud de onda de 405 nm. Un inconveniente considerable de los sustratos cromogénicos es que tanto la fibrina como las plaquetas en soluciones acuosas interfieren con la evaluación de los sustratos cromogénicos a 405 nm, y que la medición como tal es poco fiable. Por lo tanto, el uso de sustratos fluorogénicos es más popular hoy en día. Los sustratos fluorogénicos son análogos a los sustratos cromogénicos. La diferencia es que, cuando hay acción enzimática, los sustratos liberan un grupo que se puede determinar con alta sensibilidad utilizando un fluorímetro. La evaluación fluorimétrica de la generación de trombina también tiene la ventaja de que la fibrina o las plaquetas no interfieren con el análisis.

65 [0008] Además, el uso de múltiples sustratos fluorogénicos con características diferentes permite la detección de varios productos en una muestra, como se describe en WO 2006/072602. El uso de sustratos fluorogénicos también tiene inconvenientes significativos: el equipo de laboratorio estándar usado para los análisis del sistema de coagulación no sirve para el análisis fluorimétrico. Por lo tanto, el análisis requiere instrumental adicional

(fluorímetro). Además la tendencia de la última década ha sido implementar todas las pruebas de coagulación en un analizador siempre que fuera posible para simplificar el procedimiento de prueba y minimizar los costes de trabajo. El uso de un instrumento separado para medir la generación de trombina reduce significativamente su aplicabilidad como método rutinario. Además, la señal fluorescente tiene el inconveniente de no ser lineal con la concentración de producto. US503599 se refiere a sustratos luminiscentes, pero estos sustratos no son adecuados para la medición en soluciones acuosas (tales como plasma) ni son adecuados para una medición continua. Cosbi et al (Cell Notes, número 18, 2007) trata sobre sustratos luminiscentes, pero éstos no son adecuados para la medición en soluciones acuosas (tales como plasma) y ni son adecuados para una medición continua. Existe la necesidad de un ensayo nuevo para medir la generación de trombina y la generación de otros factores de coagulación de la sangre que no tenga los inconvenientes indicados anteriormente, que sea más simple y que pueda medir la generación de coagulación de la sangre y factores fibrinolíticos tales como la trombina y la plasmina de una manera directa, preferiblemente de un modo lineal. Es un objeto de la presente invención el proporcionar tal ensayo.

## 15 Resumen de la invención

[0009] La presente invención proporciona un método para determinar *in vitro* la generación de un factor de la hemostasia (trombina), generado utilizando un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor de la hemostasia tal y como se define en las reivindicaciones. Dicho sustrato quimioluminiscente usado en un método según la invención es un sustrato quimioluminogénico del que una molécula quimioluminiscente es liberada por el factor de la hemostasia y es posteriormente transformada para producir un cuanto de luz detectable.

La incorporación de una molécula quimioluminiscente en un sustrato para trombina se ha sugerido en WO 93/22453. Sin embargo, WO 93/22453 no divulga ningún sustrato quimioluminiscente adecuado. Además, la metodología para determinar la generación de trombina descrita en WO 93/22453 está orientada exclusivamente a ensayos a base de fluorescencia.

[0010] Para proporcionar un ensayo basado en el uso de sustratos quimioluminiscentes, hubo que resolver varias dificultades, incluyendo, no en último lugar, el desarrollo real de sustratos quimioluminiscentes adecuados que fueran segmentados de manera eficaz y con la suficiente especificidad por factores de la hemostasia. Al mismo tiempo, los expertos en la técnica habrían supuesto que los ensayos basados en la quimioluminiscencia serían, de hecho, demasiado complejos y, de hecho, inviables. El ensayo sobre, por ejemplo, la generación de trombina o de plasmina, que en sí mismo es ya complejo, se vuelve aún más complejo, ya que se añade otra reacción a la ecuación. Además, siempre se ha asumido que la quimioluminiscencia es difícil de medir en la sangre.

[0011] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar *in vitro* la generación de un factor de la hemostasia en una muestra de prueba que comprende: determinar la cantidad de dicho factor de la hemostasia generado utilizando un sustrato quimioluminiscente que es específico para dicho factor de la hemostasia, donde una molécula luminiscente es liberada por un factor de la hemostasia y donde dicha molécula luminiscente es posteriormente transformada para producir un cuanto de luz detectable, donde dicho factor de la hemostasia es trombina y donde el sustrato quimioluminiscente es un sustrato seleccionado del grupo consistente en:

- RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina y RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, donde R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, n es un número entero en el rango de 1-10, Sp es una fracción separadora opcional [CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>C=O, donde m es un número entero en el rango de 1-6,
- una sal del sustrato anteriormente mencionado, preferiblemente la sal de TFA.

[0012] En una divulgación, la presente invención se refiere a un equipo para determinar *in vitro* la generación de un factor de la hemostasia en una muestra de prueba, que comprende un primer contenedor que contiene un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor de la hemostasia, y uno, dos, tres o más contenedores adicionales cada uno de los cuales contiene un reactivo diferente seleccionado del grupo consistente en luciferasa, adenosina-5'-trifosfato (ATP), una fuente de Mg<sup>2+</sup> y una o más moléculas iniciadoras para inducir la generación de dicho factor de la hemostasia. Preferiblemente la molécula iniciadora es para inducir la generación de un factor de la hemostasia seleccionado del grupo que consiste en un factor de coagulación de la sangre y un factor fibrinolítico. Preferiblemente, la molécula iniciadora es para inducir la generación de un factor de la hemostasia seleccionado del grupo consistente en trombina y plasmina.

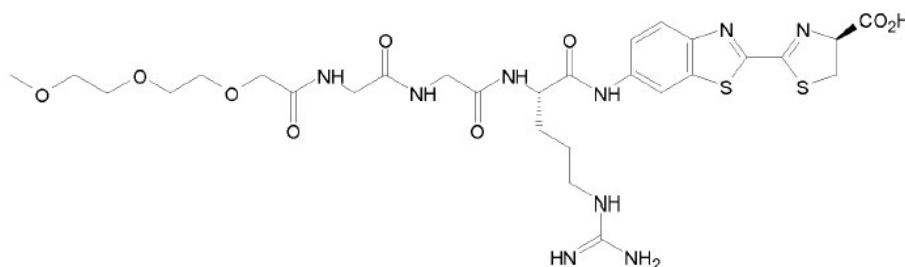
[0013] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un equipo para determinar *in vitro* la generación de trombina en una muestra de prueba, que comprende un primer contenedor que contiene un sustrato de trombina quimioluminiscente según la invención, y uno, dos, tres o más contenedores adicionales, cada uno de los cuales contiene un reactivo diferente seleccionado del grupo consistente en luciferasa, ATP, una fuente de Mg<sup>2+</sup> y una o más moléculas iniciadoras para inducir la generación de trombina.

[0014] En una divulgación, la presente invención se refiere a un equipo para determinar *in vitro* la generación de plasmina en una muestra de prueba, que comprende un primer contenedor que contiene un sustrato de plasmina quimioluminiscente, y uno, dos, tres o más contenedores adicionales cada uno de los cuales comprende un

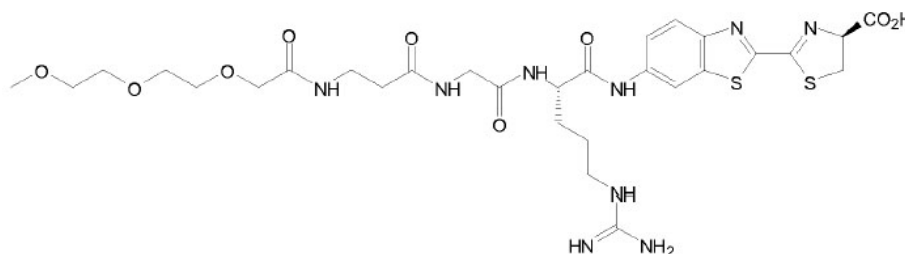
reactivo diferente seleccionado del grupo consistente en luciferasa, ATP, una fuente de  $Mg^{2+}$  y una o más moléculas iniciadoras para inducir la generación de plasmina.

- 5 [0015] En otro aspecto, la invención trata de nuevos sustratos de trombina quimioluminiscente, en particular RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina y RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, o una sal derivada, donde R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, n es un número entero en el rango de 1-10, Sp es una fracción separadora opcional. Preferiblemente n está en el rango de 1-8, más preferiblemente en el rango de 2-5. En una forma de realización R es CH<sub>3</sub>. En una forma de realización, una fracción separadora está presente. La fracción separadora opcional es [CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>C=O, donde m es un número entero en el rango de 1-6, preferiblemente 1-4.
- 10 Una fracción separadora preferida es CH<sub>2</sub>C=O. Los sustratos de trombina quimioluminiscente preferidos que se pueden usar de manera adecuada de acuerdo con la presente invención son CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-acetil-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina o una sal derivada (fórmula 1) y CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina (fórmula 2) o una sal derivada. En una forma de realización, el sustrato es una sal de TFA (ácido trifluoroacético). Estos nuevos sustratos de trombina quimioluminiscente se pueden representar por las siguientes fórmulas de estructura:
- 15

Fórmula 1

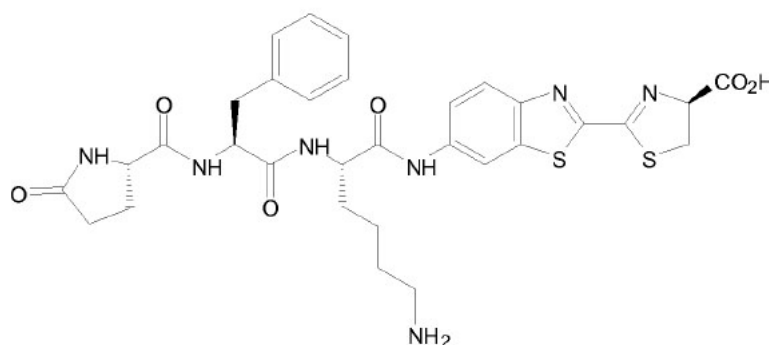


Fórmula 2



- 20 [0016] En una divulgación, la invención describe un nuevo sustrato de plasmina quimioluminiscente que puede usarse de manera adecuada, en particular piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina, o una sal derivada (fórmula 3). En una divulgación, el sustrato es una sal de TFA (ácido trifluoroacético). Este nuevo sustrato de plasmina quimioluminiscente se puede representar por la siguiente fórmula de estructura:

Fórmula 3



Los sustratos quimioluminiscentes preferidos descritos son:

- B-X-Arg-NH-Y, X-Arg-NH-Y, B-X-Lys-NH-Y o X-Lys-NH-Y, donde B es un grupo protector aminoterminal, preferiblemente Fmoc; Cbz; t-Boc; acetilo; PEG<sub>n</sub>, PEG<sub>n</sub>-acetilo, donde n es un número entero, preferiblemente en el rango de 1-5, y sus derivados de PEG(metil)éter; donde Y es una molécula indicadora quimioluminiscente enlazada al péptido por un enlace amida hidrolizable, preferiblemente Y es aminoluciferina; donde X puede ser cualquier secuencia de aminoácidos, dipéptido, tripéptido o similares y puede o no incluir una molécula separadora, donde X es preferiblemente beta-Ala-Gly o piroGlu-Phe;
- piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina.

Los sustratos preferidos según la invención son:

- CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-acetil-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina, donde n es 0, 1, 2, 3, o 4, preferiblemente 2 o 4, más preferiblemente 2;
- CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, donde n es 0, 1, 2, 3, o 4, preferiblemente 2 o 4, más preferiblemente 4;
- una sal de los sustratos mencionados anteriormente, preferiblemente la sal de TFA.

Descripción detallada de formas de realización

[0017] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar *in vitro* la generación de un factor de la hemostasia en una muestra de prueba que comprende determinar la cantidad de dicho factor de la hemostasis generado utilizando un sustrato quimioluminiscente que es específico para dicho factor de la hemostasis, donde una molécula luminiscente es liberada por un factor de la hemostasis, donde dicha molécula luminiscente es posteriormente transformada para producir un cuanto de luz detectable, donde dicho factor de la hemostasis es trombina y donde el sustrato quimioluminiscente es un sustrato seleccionado del grupo consistente en:

- RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina y RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, donde R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, n es un número entero en el rango de 1-10, Sp es una fracción separadora opcional [CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>C=O, donde m es un número entero en el rango de 1-6,
- una sal del sustrato mencionado anteriormente, preferiblemente la sal de TFA.

[0018] Los presentes inventores han descubierto que, usando tales sustratos, la generación de factor de la hemostasia, por ejemplo, la generación de trombina y la generación de plasmina, se puede medir continuamente, semicontinuosamente o de manera directa sin que se requiera un cálculo de la primera derivada como se requiere para el método cromogénico o fluorogénico para medir la generación de factores de coagulación de la sangre, por ejemplo, trombina y/o factores fibrinolíticos, por ejemplo plasmina. Típicamente, tras la segmentación de un sustrato de la invención por un factor de la hemostasia de interés, se libera una "molécula luminiscente" que es propensa a una conversión química o enzimática posterior que produce una señal luminosa detectable (o "cuanto de luz"). Ya que el cuanto de luz se produce en un paso irreversible, no hay acumulación de señal de salida.

Es una ventaja significativa del presente método, en comparación con métodos existentes que utilizan sustratos fluorescentes, que se pueda detectar a tiempo real una señal que es directamente proporcional a la cantidad del factor de la hemostasia presente en cualquier punto temporal dado; no es necesario calcular la primera derivada de una señal óptica acumulativa. En el presente método no hay interferencia con otra producción de señales de luz. Además, no se requiere ninguna fuente de luz externa ni filtros ópticos para medir la señal. Por lo tanto, el método de la presente invención es mucho más conveniente que los métodos del estado de la técnica.

[0019] En conjunto, la presente invención proporciona un método mejorado y sensible para supervisar la generación de trombina en una muestra de prueba. El método de la presente invención permite el diseño de un dispositivo óptico de cabecera para medir la generación de uno o más factores de la hemostasia.

[0020] El factor de la hemostasia descrito puede ser cualquier factor de coagulación de la sangre y se puede seleccionar del grupo de las serina proteasas, en particular serina endopeptidasas (EC 3.4.21), preferiblemente seleccionadas del grupo consistente en trombina, Factor Xa, plasmina, factor VIIa, factor IXa, calicreína plasmática, factor XIIIa, factor XIa, activador tisular del plasminógeno (tPA), preferiblemente tc-tPA, proteína C activada y uroquinasa (uPA) preferiblemente tc-UPA. En una divulgación, el factor de la hemostasia es la plasmina.

[0021] La generación de factores de la hemostasia se puede detectar utilizando una aminoluciferina modificada con amino, modificación que incluye un sustrato para el factor de la hemostasia que se genera.

Los sustratos adecuados para supervisar la reacción de coagulación incluyen péptidos derivatizados que son específicamente segmentados por dicho factor de la hemostasia, por ejemplo, el factor de coagulación de la sangre trombina o el de factor fibrinolítico plasmina que se produce como acontecimiento final en la vía de coagulación o después de la formación de fibrina. Los péptidos están enlazados a una molécula indicadora quimioluminiscente, tal como la aminoluciferina, a la vez que mantienen la capacidad de ser segmentados.

El factor de coagulación de la sangre, por ejemplo la trombina o plasmina, es capaz de reconocer el péptido, segmentar el enlazador segmentable y una molécula indicadora quimioluminiscente, tal como la aminoluciferina, se forma en presencia de ATP, luciferasa y, opcionalmente, Mg<sup>2+</sup> que típicamente resulta en una emisión de luz.

[0022] El método de la invención puede utilizarse para determinar los efectos de fármacos, inhibidores, proteínas, células u otros aditivos en la generación de trombina. Para medir el efecto de tales aditivos, éstos se pueden añadir a la mezcla reactiva. Estos aditivos también se pueden colocar en los pocillos del contenedor donde se realiza el ensayo, tal como los pocillos de placas de 96 pocillos. Cuando las células endoteliales forman parte de la mezcla reactiva, éstas se pueden cultivar en los pocillos.

[0023] La señal luminiscente se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica. Los métodos de detección adecuados comprenden el uso de un equipo de detección de luz, que incluye, sin limitación, un luminómetro, una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD), una película radiográfica, y una película fotográfica de alta velocidad. Típicamente, dicho luminómetro comprende un tubo fotomultiplicador (PMT) sensible al azul, un tubo fotomultiplicador (PMT) sensible al rojo u otros PMT optimizados para aplicaciones específicas. Preferiblemente, dichos métodos de detección de luz también incluyen el uso de un dispositivo de filtración óptica para bloquear o reducir la emisión de luz no deseada o bien del sustrato o bien del producto.

Los métodos de detección puede incluir además un método y/o un dispositivo para detectar o registrar luz de una manera secuencial que elimina o reduce las señales no deseadas del sustrato. Dicha señal luminiscente preferiblemente se mide continuamente, semicontinualmente o de forma no continua. La cantidad de factor de la hemostasia (por ejemplo, trombina o plasmina) es directamente proporcional a la señal medida, de manera que no hay necesidad de transformar la señal medida en una primera derivada. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, se proporciona un método tal y como se define en el presente documento, donde la determinación de la cantidad de dicho factor de la hemostasia (trombina) generado mediante la medición de una señal luminiscente no implica el cálculo de la primera derivada de dicha señal luminiscente.

[0024] En una forma de realización, el método de la invención comprende: proporcionar una mezcla reactiva que comprende una muestra de prueba que debe evaluarse, una molécula iniciadora para inducir la generación de factor de la hemostasia (trombina), y un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor de la hemostasia, por ejemplo trombina o plasmina; y determinar la cantidad de dicho factor de la hemostasia generado mediante la medición de una señal luminiscente, preferiblemente utilizando una luciferasa, típicamente en presencia de ATP. Preferiblemente la mezcla reactiva que se proporciona comprende  $Mg^{2+}$ .

[0025] La mezcla reactiva puede comprender uno o más iniciadores de la coagulación. Se puede emplear una variedad de iniciadores de la coagulación adecuados. Tales iniciadores activan las vías de coagulación en los puntos estándar que se usan habitualmente para las pruebas médicas. Por ejemplo, el factor tisular iniciador de la vía de coagulación extrínseca, junto con el factor VII y el calcio activan el Factor X o bien directa o bien indirectamente primero a través de la activación del factor IX. El iniciador de la vía de coagulación intrínseca activará el factor XII para sucesivamente activar el factor XI. En la técnica se conocen iniciadores adecuados de la vía de coagulación extrínseca, e incluyen el factor tisular y similares. También se conocen en la técnica iniciadores adecuados para la vía de coagulación intrínseca e incluyen ácido elálgico, caolín, sílice y similares.

Se proporciona una descripción de estos y otros iniciadores en Laboratory Evaluation of Hemostasis and Thrombosis (tercera edición), 1983, Marjorie S. Sirridge y Reaner Shannon, Lea & Febiger, Philadelphia; y Hemostasis and Thrombosis, a conceptual approach (segunda edición), 1983, Jack Hirsh and Elizabeth Brain, Churchill Livingstone, Nueva York.

[0026] La mezcla reactiva también contiene de manera adecuada estructuras que tienen una superficie que contiene fosfolípidos. La superficie que contiene fosfolípidos comprende adecuadamente fosfolípidos cargados negativamente, es decir, fosfolípidos aniónicos, tales como la fosfatidilserina. Ejemplos adecuados de los mismos incluyen vesículas fosfolípicas, cefalina, células, en particular células endoteliales (activadas), plaquetas (activadas), bacterias, virus, matrices de células endoteliales (activas) o microvesículas u otras estructuras adecuadas conocidas por el experto en la materia. La presencia de tales estructuras es particularmente ventajosa en formas de realización relacionadas con los factores de coagulación dependientes de la vitamina K. Tales factores de coagulación dependientes de la vitamina K se unen a superficies que contienen fosfolípidos aniónicos a través de los denominados dominios GLA. Los cofactores también se unen típicamente a las superficies. La presencia de estructuras que expresan superficies que contienen fosfolípidos aniónicos acelera la reacción de factores de coagulación dependientes de la vitamina K en varios órdenes de magnitud.

[0027] La mezcla reactiva también puede incluir fibrina, un fragmento de fibrina o una sustancia generadora de fibrina. La fibrina es un cofactor importante para la generación de plasmina inducida por tPA. Así, en una divulgación, la mezcla reactiva comprende fibrina o un fragmento de fibrina adecuado para actuar como cofactor para la generación de plasmina.

[0028] En una divulgación, el sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor de la hemostasia comprende un péptido que comprende un sitio de escisión específico para dicho factor de la hemostasia enlazado de manera covalente o acoplado de otro modo a preferiblemente el grupo amino de la aminoluciferina o al derivado modificado del carboxilo terminal a través de un enlace peptídico. Preferiblemente, el N-terminal del sustrato se modifica para evitar la degradación por aminopeptidasas, por ejemplo, utilizando un grupo de

protección aminoterminal; estos son conocidos para la persona experta en la técnica. En caso de que el factor de la hemostasia sea trombina, el sustrato de trombina quimioluminiscente puede comprender un péptido que comprende un sitio de escisión de trombina acoplado a aminoluciferina. En caso de que el factor de la hemostasia sea plasmina, el sustrato de plasmina quimioluminiscente puede comprender un péptido que

5

[0029] En ausencia del factor de la hemostasia, una mezcla que comprende un sustrato específico para un factor de la hemostasia generará una luz mínima al estar presente una mínima aminoluciferina libre. En presencia del factor de la hemostasia apropiado, el enlace peptídico que enlaza el sustrato y la aminoluciferina puede ser segmentado por el factor de la hemostasia para producir aminoluciferina, un sustrato para la luciferasa. Así, en presencia de luciferasa, se genera luz, que es proporcional a la cantidad de factor de la hemostasia generado.

10

[0030] El sustrato quimioluminiscente descrito específico para dicho factor de la hemostasia puede ser de la forma B-X-Arg-NH-Y, X-Arg-NH-Y, B-X-Lys-NH-Y o X-Lys-NH-Y, donde B es un grupo protector aminoterminal, y X puede ser cualquier secuencia de aminoácidos, dipéptido, tripéptido, o similares y puede o no incluir una molécula separadora; preferiblemente, X es beta-Ala-Gly o piroGlu-Phe. Los grupos protectores aminoterminales adecuados incluyen, sin limitación, Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo), Cbz (benciloxycarbonilo), t-Boc (tert-butiloxycarbonilo), acetilo, PEG<sub>n</sub> y PEG<sub>n</sub>-acetilo donde n está en el rango de 1-20, preferiblemente en el rango de 1-10, preferiblemente en el rango de 1-8, más preferiblemente en el rango de 1-5, de la forma más preferible n es 5 y sus derivados de PEG (metil)éter. Y es la molécula indicadora quimioluminiscente, enlazada al péptido por un enlace amida hidrolizable. Típicamente, Y será convertida por la luciferasa y, por lo tanto, producirá un cuanto de luz sólo después que el enlace amida haya sido hidrolizado por dicho factor de la hemostasia, por ejemplo, trombina o plasmina. Antes de la hidrólisis del enlace amida, la molécula indicadora no puede ser convertida. En una divulgación apropiada, Y puede ser aminoluciferina.

15

20

25

[0031] Los ejemplos de péptidos de sustrato ejemplares para la trombina incluyen beta-Ala-Gly-Arg enlazada a aminoluciferina, PEG<sub>n</sub>-acetil-Gly-Gly-Arg enlazada a aminoluciferina, donde n es preferiblemente 1, 2, 3, 4 o 5, más preferiblemente n es 3, y PEG<sub>n</sub>-acetil-beta-Ala-Gly-Arg enlazada a aminoluciferina, donde n es preferiblemente 1, 2, 3, 4 o 5, más preferiblemente n = 5. Preferiblemente el PEG está en la forma de su metiléter, por lo tanto CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>. Debe observarse que, en las formas de realización de la invención, PEG<sub>n</sub> corresponde a CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n-1</sub>; por ejemplo PEG<sub>3</sub> corresponde a CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>. Los últimos dos sustratos (PEG<sub>n</sub>-acetil-Gly-Gly-Arg enlazado a aminoluciferina y PEG<sub>n</sub>-acetil-beta-Ala-Gly-Arg enlazado a aminoluciferina) son especialmente adecuados, ya que son solubles y son segmentados por la trombina. Los sustratos que comprenden beta-Ala-Gly-Arg enlazado a aminoluciferina son altamente preferidos porque tienen una alta especificidad para la trombina y no son sensibles a, por ejemplo, la plasmina. Los sustratos que comprenden Gly-Gly-Arg-aminoluciferina pueden ser sensibles a, por ejemplo, la plasmina, que puede estar presente en el plasma.

30

35

40

[0032] Los péptidos de sustrato ejemplares descritos para la plasmina incluyen Cbz-Phe-Arg-aminoluciferina, Ac-Phe-Arg-aminoluciferina, Phe-Arg-aminoluciferina, y PEG<sub>n</sub>-acetil-Phe-Arg-aminoluciferina, donde n es preferiblemente 1, 2, 3, 4 o 5, más preferiblemente n es 5. Preferiblemente, el PEG está en la forma de su metiléter, por lo tanto CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>. Otro sustrato preferido es piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina o la sal de TFA derivada de ésta.

45

[0033] Otros sustratos preferidos según la invención son:

- CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, donde n es 0, 1, 2, 3 o 4, preferiblemente 2 o 4, más preferiblemente 4;
- CH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-acetil-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina, donde n es 0, 1, 2, 3, o 4, preferiblemente 2 o 4, más preferiblemente 2;
- una sal de los sustratos mencionados anteriormente, preferiblemente la sal de TFA.

50

[0034] La mezcla reactiva puede comprender además una luciferasa capaz de convertir la aminoluciferina en amino-oxiluciferina, y ATP y preferiblemente comprende además Mg<sup>2+</sup>. El principio de quimioluminiscencia utilizando luciferasa es ampliamente conocido por la persona experta. Típicamente utiliza luciferasa, luciferina, ATP y oxígeno para la producción de fotones. La luciferasa cataliza la conjugación de luciferina a ATP y la oxidación posterior de la sustancia intermedia luciferil-AMP. Por último, la luciferasa proporciona un entorno en el que la sustancia intermedia de luciferina oxidada se reordena para producir oxiluciferina y un único fotón con una eficiencia cuántica elevada. La intensidad de la luz resultante de tal luminiscencia depende de las concentraciones de los componentes implicados en la conversión química o enzimática de la molécula luminiscente liberada. Al usar un exceso de tales componentes, la señal luminiscente del método de la invención se vuelve dependiente sólo de la generación de moléculas luminiscentes libres por segmentación del sustrato por el factor de la hemostasia de interés, por ejemplo, trombina o plasmina. En tales circunstancias, la intensidad de la luz, por lo tanto, es proporcional a la generación de dicho factor de la hemostasia, por ejemplo, a la generación de trombina o de plasmina.

60

65

[0035] La reacción también puede comprender iones de magnesio, puesto que se ha observado que éstos agrandan la señal luminiscente generada. Sin embargo, también es posible conseguir este efecto con otros cationes bivalentes.

5 [0036] La luciferasa puede ser cualquier luciferasa conocida en la técnica o que se descubra o diseñe en el futuro. En la técnica se conocen muchas luciferasas. Éstas se pueden obtener comercialmente de fabricantes tales como Promega, Sigma y similares. La luciferasa puede ser una luciferasa nativa, recombinante o mutante. Dicha luciferasa mutante puede ser una luciferasa modificada que comprende una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones de aminoácidos o inserciones de aminoácidos, siempre que conserve su actividad de  
10 luciferasa, preferiblemente al menos 25%, 50%, 75% de la actividad de luciferasa de la luciferasa (recombinante) nativa. Puede ser derivada de cualquier organismo, siempre que tenga actividad de luciferasa.

[0037] La muestra de prueba puede ser cualquier tipo de muestra de prueba conocido por la persona experta. La muestra de prueba se puede seleccionar del grupo consistente en células, fluidos fisiológicos, sangre, orina, esputo y similares. En una forma de realización adecuada, la muestra de prueba se selecciona del grupo  
15 consistente en sangre total, fluido de drenaje, plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas.

[0038] La molécula iniciadora para inducir la generación de dicho factor de coagulación de la sangre, tal como la trombina, puede ser un iniciador de la vía extrínseca, en particular factor tisular, o de la vía intrínseca, en particular seleccionado del grupo consistente en vidrio, sílice, caolín y ácido elálgico. La molécula iniciadora *in vivo* para inducir la generación de factores de coagulación de la sangre, tal como la trombina, es, de manera adecuada, factor tisular (TF). El TF media en la formación de trombina formando complejos con el factor VIIa para convertir directamente el Factor X en Factor Xa (vía extrínseca), o indirectamente generando Factor Xa mediante la conversión de Factor IX en factor IXa, que, a su vez, forma complejos con el factor VIIIa para  
20 convertir el factor X en factor Xa. El factor Xa, una vez ha sido generado, forma complejos con su cofactor, V(a), para convertir la protrombina (II) en trombina (IIa). El TF es preferido porque es el mismo activador que se encuentra en el cuerpo para la vía extrínseca. Los activadores para la vía intrínseca son, por ejemplo, superficies como vidrio, caolín, sílice, o ácido elálgico. En una forma de realización, el método según la invención comprende:

- 30 – permitir que el factor Xa convierta la protrombina en trombina;
- permitir que la trombina convierta el sustrato de trombina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina; y
- permitir que la luciferasa convierta la aminoluciferina en amino-oxiluciferina tras la producción de un cuanto de luz.

[0039] En una forma de realización, el método de la invención comprende: permitir que un iniciador de la vía extrínseca genere en presencia de factor VII(a) Factor Xa o factor IXa, permitir que el factor IXa genere factor Xa, permitir que el factor Xa convierta la protrombina en trombina; permitir que la trombina convierta el sustrato de trombina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina; y permitir que la luciferasa convierta aminoluciferina  
40 en amino-oxiluciferina con la producción de un cuanto de luz.

[0040] En una forma de realización, el método de la invención comprende: permitir que un iniciador de la vía intrínseca genere factor XIIa, permitir que el factor XIIa genere factor XIa, permitir que el factor XIa genere factor IXa, permitir que el factor IXa genere Factor Xa, permitir que el factor Xa convierta la protrombina en trombina; permitir que la trombina convierta el sustrato de trombina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina; y permitir que la luciferasa convierta la aminoluciferina en amino-oxiluciferina con la producción de un cuanto de luz.

[0041] Se describe que la molécula iniciadora para inducir la generación de plasmina se puede seleccionar del grupo consistente en uroquinasa, estreptoquinasa, y activador tisular del plasminógeno, y es preferiblemente activador tisular del plasminógeno. La molécula iniciadora se puede aislar de manera natural o se puede producir por metodología recombinante. De este modo, el grupo de moléculas iniciadoras también comprende uroquinasa recombinante, estreptoquinasa recombinante y activador tisular del plasminógeno recombinante. La plasmina se forma por activación de la proenzima, plasminógeno, por activadores tisulares del plasminógeno. Los activadores tisulares del plasminógeno se encuentran en muchos tejidos. El activador tisular del plasminógeno es liberado por células endoteliales y plaquetas activadas. La molécula iniciadora para inducir la generación de plasmina en el ensayo de la invención es, de manera adecuada, activador tisular del plasminógeno (tPA) porque también es el iniciador en la situación natural en el cuerpo. La uroquinasa y la estreptoquinasa son ejemplos de otros.

[0042] En una divulgación, el método de la invención comprende: permitir que la uroquinasa, estreptoquinasa o tPA convierta el plasminógeno en plasmina, opcionalmente en presencia de fibrina o fragmentos de fibrina; permitir que la plasmina convierta el sustrato de plasmina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina; y permitir que la luciferasa convierta la aminoluciferina en amino-oxiluciferina con la producción de un cuanto de luz.

65



5 [0043] En una forma de realización, el método de la invención incluye: i) conversión de protrombina en trombina por Factor Xa; conversión de factor X en factor Xa por complejo TF-Factor VIIa o complejo factor IXa Factor-VIII(a); conversión de factor VII en factor VIIa por complejo TF-factor-VIIa; conversión de plasminógeno en plasmina por tPA o uPA o estreptoquinasa o con una eficacia menor por los factores intrínsecos factor XIIa, factor XIa y calicreína; conversión de factor IX en factor IXa por complejo TF-VIIa o por factor XIa; conversión de factor XI en factor XIa por factor XIIa o trombina; conversión de factor XII en factor XIIa por precalicreína o factor XIIa; conversión de precalicreína en calicreína por vidrio, caolín, sílice o ácido eláxico; conversión de proteína C en proteína C activada por complejo de trombina-trombomodulina; conversión de inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina en inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina activado, por trombina o complejo de trombina-trombomodulina; conversión de tPA de cadena sencilla (sc-tPA) en tPA de cadena doble (tc-tPA) por plasmina o con eficacia inferior por Factor Xa y calicreína; conversión de uPA de cadena sencilla en uPA de cadena doble por plasmina o con eficacia inferior por factor XIIa y calicreína; ii) conversión de un sustrato específico para el factor de la hemostasia generado en aminoluciferina por trombina formada en i); y iii) conversión de aminoluciferina en amino-oxiluciferina por luciferasa con la que se produce un único fotón con una eficiencia cuántica elevada (Cosby et al. 2007. Cell notes. Número 18:9-11). Al mantener las concentraciones de todos los componentes en la constante de reacción, salvo el factor de la hemostasia en cuestión, la intensidad de la luz es proporcional a la concentración de dicho factor de la hemostasia.

20 [0044] Los sustratos quimioluminiscentes descritos en el primer aspecto de la invención se proporcionan como tales en otro aspecto de la invención.

25 [0045] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un equipo para determinar *in vitro* la generación de trombina en una muestra de prueba, que comprende un primer contenedor que contiene un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor de la hemostasia (trombina) y uno, dos, tres o más contenedores adicionales cada uno de los cuales contiene un reactivo diferente seleccionado del grupo consistente en luciferasa, ATP, una fuente  $Mg^{2+}$  y una molécula activadora para inducir la generación de dicho factor de la hemostasia, donde el sustrato quimioluminiscente es preferiblemente un sustrato quimioluminiscente según la invención.

30 [0046] La molécula iniciadora para la generación de dicho factor de la coagulación de la sangre (trombina) puede ser un iniciador de la vía extrínseca, en particular factor tisular (TF), o un iniciador de la vía intrínseca, en particular vidrio, caolín y ácido eláxico.

35 [0047] El sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor de la hemostasia (trombina), puede ser tal y como se ha definido anteriormente.

40 [0048] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un equipo para determinar *in vitro* la generación de trombina en una muestra de prueba, que comprende un primer contenedor que contiene un sustrato de trombina quimioluminiscente, preferiblemente un sustrato de trombina quimioluminiscente según la invención, y uno, dos, tres o más contenedores adicionales, cada uno de los cuales contiene un reactivo diferente seleccionado del grupo consistente en luciferasa, ATP, una fuente de  $Mg^{2+}$  y una molécula iniciadora para inducir la generación de trombina.

45 [0049] En una divulgación, la presente invención se refiere a un equipo para determinar *in vitro* la generación de plasmina en una muestra de prueba, que comprende un primer contenedor que contiene un sustrato de plasmina quimioluminiscente, preferiblemente un sustrato de plasmina quimioluminiscente según la invención, y uno, dos, tres o más contenedores adicionales cada uno de los cuales comprende un reactivo diferente seleccionado del grupo consistente en luciferasa, ATP, una fuente de  $Mg^{2+}$  y una molécula iniciadora para inducir la generación de plasmina.

50 [0050] La molécula iniciadora para inducir la generación de plasmina se puede seleccionar del grupo consistente en uroquinasa, estreptoquinasa, y activador tisular del plasminógeno (tPA).

55 [0051] El equipo puede comprender además un fosfolípido aniónico que contiene superficie y/o una fibrina, un fragmento de fibrina o una sustancia generadora de fibrina.

[0052] El equipo también puede comprender además un contenedor que contiene uno o más iniciadores de la coagulación como se ha descrito anteriormente.

60 [0053] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que se incluyen los elementos que van después de la palabra, pero los artículos que no se mencionan específicamente no están excluidos. Además, el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en" con el significado de que una composición de la invención puede comprender componente(s) adicional(es) a los que se identifican específicamente, sin que dicho(s) componente(s) adicional(es) alteren las características propias de la invención.

[0054] Además, la referencia a un elemento con el artículo indefinido "a" o "un" no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "a" o "un", por lo tanto, normalmente significa "al menos uno".

## 5 Ejemplos

Ejemplo 1: rasgos de dos sustratos típicos

El ensayo quimioluminiscente para medir la generación de trombina en plasma

10 [0055] En una placa de 96 pocillos (volumen final 120  $\mu$ l), se añadieron los componentes siguientes:  
 80  $\mu$ l de mezcla de plasma normal (NPP),  
 2  $\mu$ l de cefalina (número de producto de Roche 524298; disueltos en 1 ml de agua destilada)  
 2  $\mu$ l de factor tisular (Innovin, Siemens Healthcare Diagnostics, diluido 500 veces),  
 15 10  $\mu$ l de sal de TFA MeO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina (sustrato específico de trombina (10 mM)), o sal de TFA piro Glu-Phe-Lys-aminoluciferina (sustrato específico de plasmina (10mM))  
 2  $\mu$ l de tPA recombinante (Actilyse®, Boehringer Ingelheim, 193 IU/ml),  
 2  $\mu$ l de luciferasa (Sigma; 72 $\mu$ g/ml),  
 2  $\mu$ l de ATP (Sigma, 0,33 mM),  
 20 2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (8,3 mM)  
 14  $\mu$ l de tampón de TRIS/NaCl (50 mM de TRIS y 150 mM de NaCl, pH 7.4).

25 [0056] Esta mezcla reactiva se mezcló, seguido por la adición de 4  $\mu$ l de tampón de TRIS/NaCl con Ca<sup>2+</sup> para iniciar la generación de trombina. Concentración Final 16,7 mM. El resultante se mezcló rápidamente, y generación de trombina se supervisó en un Fluostar. Los ajustes del Fluostar fueron: 140 ciclos de 30 segundos, Ganancia: Máximo = 4095. Antes de la medición, se tomaron 25  $\mu$ l de mezcla reactiva del pocillo con un volumen total de 120  $\mu$ l. Ésta se pipeteó en una placa microtituladora de 384 pocillos adecuada para medir la luminiscencia. La medición se inició inmediatamente. La luminiscencia se representa en unidades relativas de luminiscencia (RLU).

30 Sustratos:

35 [0057] Los sustratos usados para llevar a cabo este ensayo de luminiscencia fueron un sustrato específico de trombina (S1: sal de TFA MeO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina) y un sustrato específico de plasmina (sal de TFA S2: piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina)

Experimentos

40 [0058] La reactividad de S1 y S2 se determinó en tampón y plasma. Se llevaron a cabo mediciones bajo las condiciones de ensayo según se ha mencionado anteriormente a menos que se indique lo contrario por experimentos individuales.

Resultados:

45 [0059] La Figura 1 demuestra la reactividad de la trombina y la plasmina en el sustrato S1 (Fig. 1a) utilizando 150 nM de trombina (línea continua) y 40 nM de plasmina (línea discontinua) y la reactividad de la trombina y la plasmina en el sustrato S2 (Fig. 1b) utilizando 4 nM de plasmina (línea discontinua) y 15 nM de trombina (línea continua) en tampón TBS con las concentraciones de luciferasa, ATP, MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> como se ha descrito anteriormente. Estos resultados indican que los sustratos son más susceptibles para su enzima respectiva.

50 [0060] La Figura 2 demuestra la intensidad de la luminiscencia del sustrato de trombina S1 (Fig. 2a) o del sustrato de plasmina S2 (Fig. 2b) en la mezcla de plasma normal sin tPA (línea continua), con tPA (línea discontinua) y plasma deficitario en FVIII incubado con tPA (línea de puntos).

55 [0061] La Figura 3 demuestra el efecto del magnesio en la conversión de S1 (Fig. 3a) y S2 (Fig. 3b) en un ensayo regular con mezcla de plasma normal con una concentración final de 8,3 mM (línea continua), 0,83 mM (línea discontinua) y sin magnesio (línea de puntos).

Ejemplo 2: se testaron varios sustratos con plasmina y trombina.

60 [0062] Se analizaron varios sustratos utilizando trombina y plasmina. El ensayo se realizó esencialmente como se describe en el ejemplo 1. Sin embargo, en lugar de plasma, se añadieron plasmina o trombina a concentraciones finales de 30nM (trombina) o 40nM (plasmina).

65 [0063] En la tabla 1 se representan resultados para los distintos sustratos. Como se puede observar claramente, la plasmina y la trombina inducen señales de luminiscencia específicas.

Substrato	RLU trombina	RLU plasmina	RLU trombina/RLU plasmina
CH <sub>3</sub> O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> -acetil-Phe-Arg-aminoluciferina · TFA	300946	759874	0,40
CH <sub>3</sub> O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> -acetil-Phe-Arg-aminoluciferina · TFA	340768	1282351	0,27
PiroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina · TFA	139546	1999875	0,07
H-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina · 2TFA	292161	62387	4,7
Cbz-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina · TFA*	771302	146486	5,3
CH <sub>3</sub> O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> -acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina · TFA	814171	251299	3,2
CH <sub>3</sub> O-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina · TFA	925567	294631	3,1
CH <sub>3</sub> O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> -acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina · TFA	293198	134983	2,2
*solubilidad muy baja en tampón +10% de DMSO; no soluble en el tampón sin DMSO			

#### Leyendas de la figura

5 [0064] La Figura 1 representa la reactividad de la trombina y la plasmina en el sustrato S1 (sal de TFA CH<sub>3</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-acetil-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina) (Fig. 1a) utilizando 150 nM de trombina (línea continua) y 40 nM de plasmina (línea discontinua) y la reactividad de trombina y plasmina en el sustrato S2 (sal de TFA piroGlu-Phe-Lys-aminoluciferina) (Fig. 1b) utilizando 4 nM de plasmina (línea discontinua) y 15 nM de trombina (línea continua) en tampón de solución salina tamponada Trsi (TBS) con las concentraciones de luciferasa, ATP, MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> descritas anteriormente. Estos resultados indican que los sustratos son más susceptibles para su enzima respectiva.

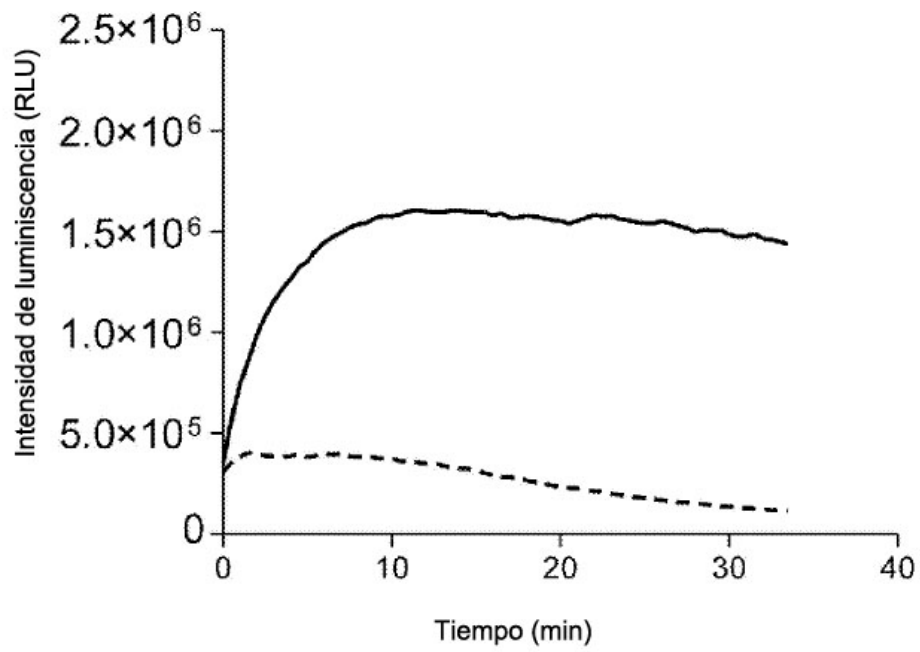
15 [0065] La Figura 2 representa la intensidad de luminiscencia del sustrato de trombina S1 (Fig. 2a) o el sustrato de plasmina S2 (Fig. 2b) en mezcla de plasma normal sin tPA (línea continua), con tPA línea discontinua) y en plasma deficiente en FVIII incubado con tPA (línea de puntos).

20 [0066] La Figura 3 representa el efecto del magnesio en la conversión de S1 (Fig. 3a) y S2 (Fig. 3b) en un ensayo regular con mezcla de plasma normal con una concentración final de 8,3 mM (línea continua), 0,83 mM (línea discontinua) y sin magnesio (línea de puntos).

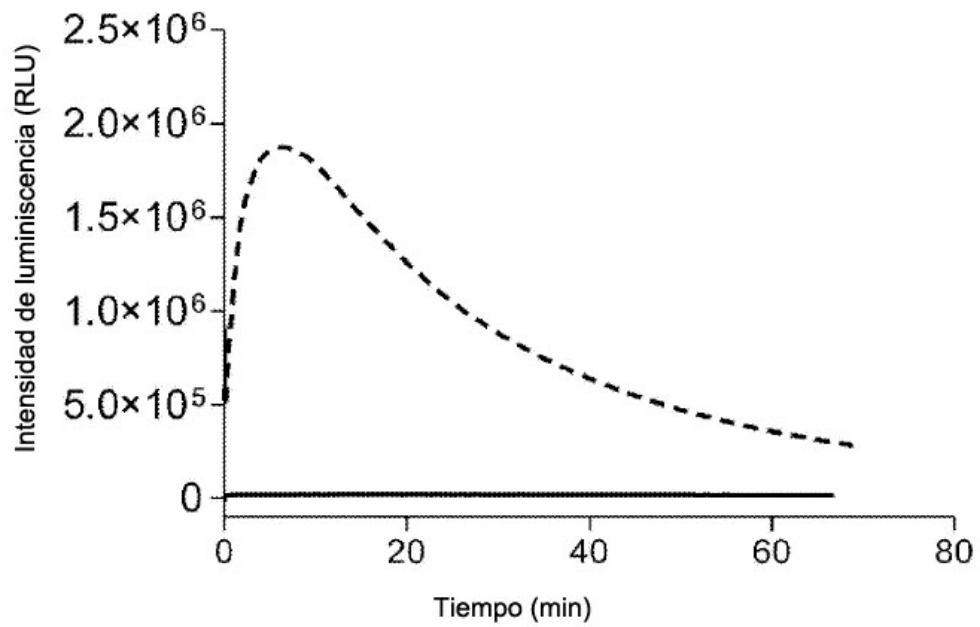
## REIVINDICACIONES

1. Método para determinar *in vitro* la generación de un factor de la hemostasia en una muestra de prueba que comprende determinar la cantidad de dicho factor de la hemostasia generado utilizando un sustrato quimioluminiscente que es específico para dicho factor de la hemostasia, donde una molécula luminiscente es liberada de dicho sustrato quimioluminiscente por dicho factor de la hemostasia, molécula luminiscente la cual es posteriormente transformada para producir un cuanto de luz detectable, donde dicho factor de la hemostasia es la trombina y donde el sustrato quimioluminiscente es un sustrato seleccionado del grupo consistente en:
- RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina y RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, donde R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, n es un número entero en el rango de 1-10, Sp es una fracción separadora opcional [CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>C=O, donde m es un número entero en el rango de 1-6,
  - una sal del sustrato mencionado anteriormente, preferiblemente la sal de TFA.
2. Método según la reivindicación 1, donde n está en el rango de 1-8, preferiblemente en el rango de 2-5.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde R es CH<sub>3</sub>.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el separador es CH<sub>2</sub>C=O.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
- proporcionar una mezcla reactiva que comprende una muestra de prueba que debe evaluarse, una molécula iniciadora para inducir la generación de dicho factor de la hemostasia, un sustrato quimioluminiscente específico para dicho factor de la hemostasia; y
  - determinar la cantidad de dicho factor de la hemostasia generado mediante la medición de una señal luminiscente.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la mezcla reactiva comprende además una luciferasa capaz de convertir la aminoluciferina en amino-oxiluciferina y ATP, y preferiblemente comprende además Mg<sup>2+</sup>.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra de prueba se selecciona del grupo consistente en sangre total, fluido de drenaje, plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas.
8. Método según la reivindicación 5, donde la molécula iniciadora para inducir la generación de trombina es un iniciador de la vía extrínseca, en particular factor tisular, o de la vía intrínseca, en particular seleccionado del grupo consistente en vidrio, caolín, sílice y ácido elálgico.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
- permitir que el factor Xa convierta la protrombina en trombina;
  - permitir que la trombina convierta el sustrato de trombina quimioluminiscente en péptido y aminoluciferina; y
  - permitir que la luciferasa convierta la aminoluciferina en amino-oxiluciferina con la producción de un cuanto de luz.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la determinación de la cantidad de dicho factor de la hemostasia generado mediante la medición de una señal luminiscente no implica el cálculo de la primera derivada de dicha señal luminiscente.
11. Sustrato quimioluminiscente seleccionado del grupo consistente en:
- RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-Gly-Gly-Arg-aminoluciferina y RO-[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O]<sub>n</sub>-(Sp)-beta-Ala-Gly-Arg-aminoluciferina, donde R es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, n es un número entero en el rango de 1-10, Sp es una fracción separadora opcional [CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>C=O, donde m es un número entero en el rango de 1-6,
  - una sal del sustrato mencionado anteriormente, preferiblemente la sal de TFA.
12. Sustrato según la reivindicación 11, donde n está en el rango de 1-8, preferiblemente en el rango de 2-5.
13. Sustrato según la reivindicación 11 o 12, donde R es CH<sub>3</sub>.
14. Sustrato según cualquiera de las reivindicaciones 11 - 13, donde el separador es CH<sub>2</sub>C=O.
15. Equipo para determinar *in vitro* la generación de trombina en una muestra de prueba, que comprende un primer contenedor que contiene un sustrato quimioluminiscente según cualquiera de las reivindicaciones 11 - 14, y uno o más contenedores adicionales cada uno de los cuales contiene un reactivo diferente seleccionado del grupo consistente en luciferasa, ATP, una fuente de Mg<sup>2+</sup> y una molécula iniciadora para inducir la generación de dicho factor de la hemostasia.

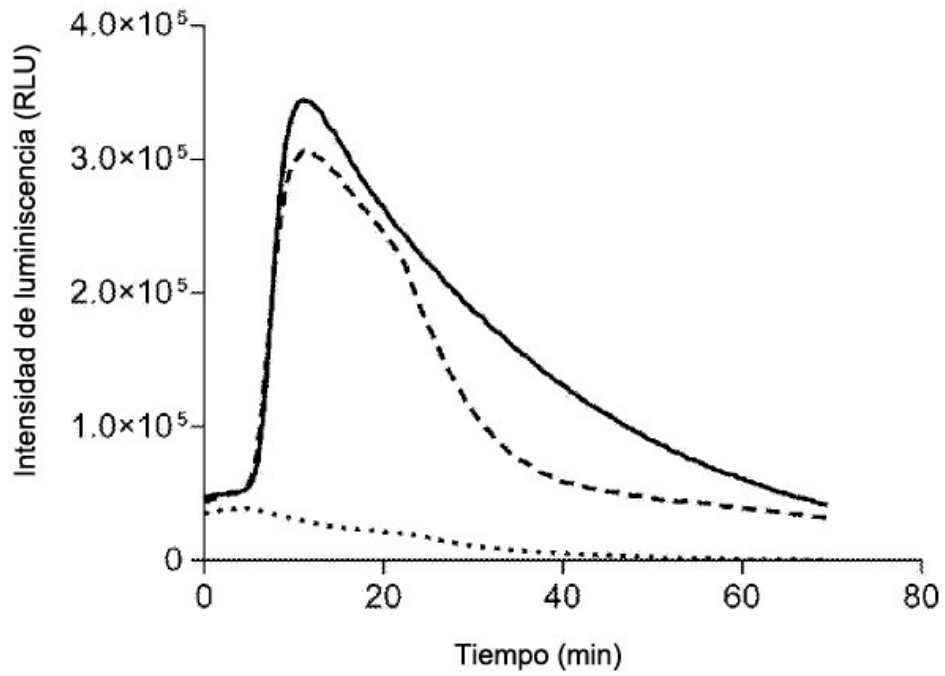
*Fig 1a*



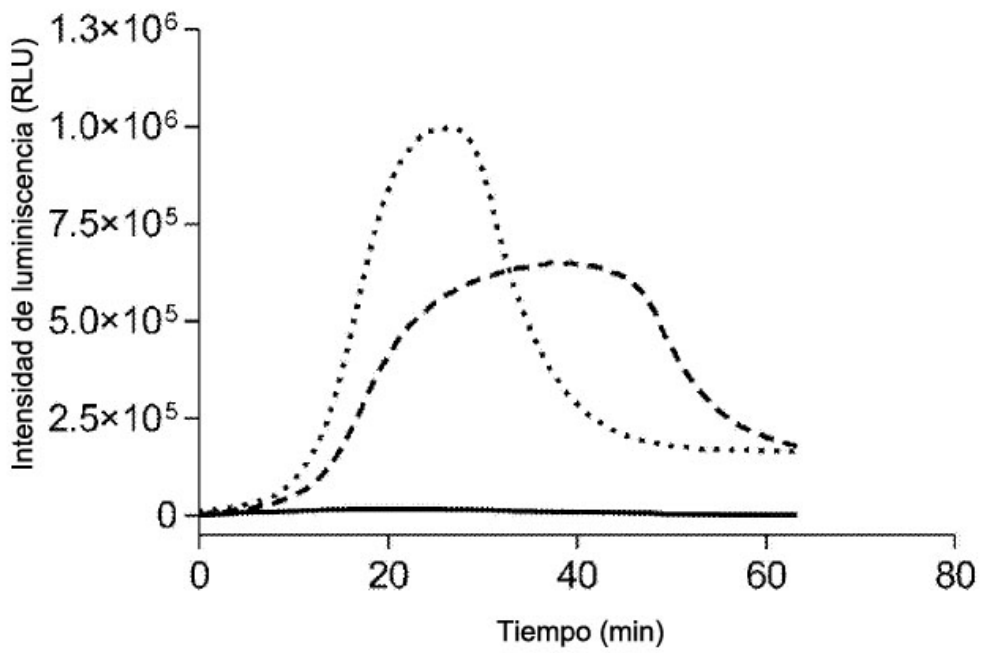
*Fig 1b*



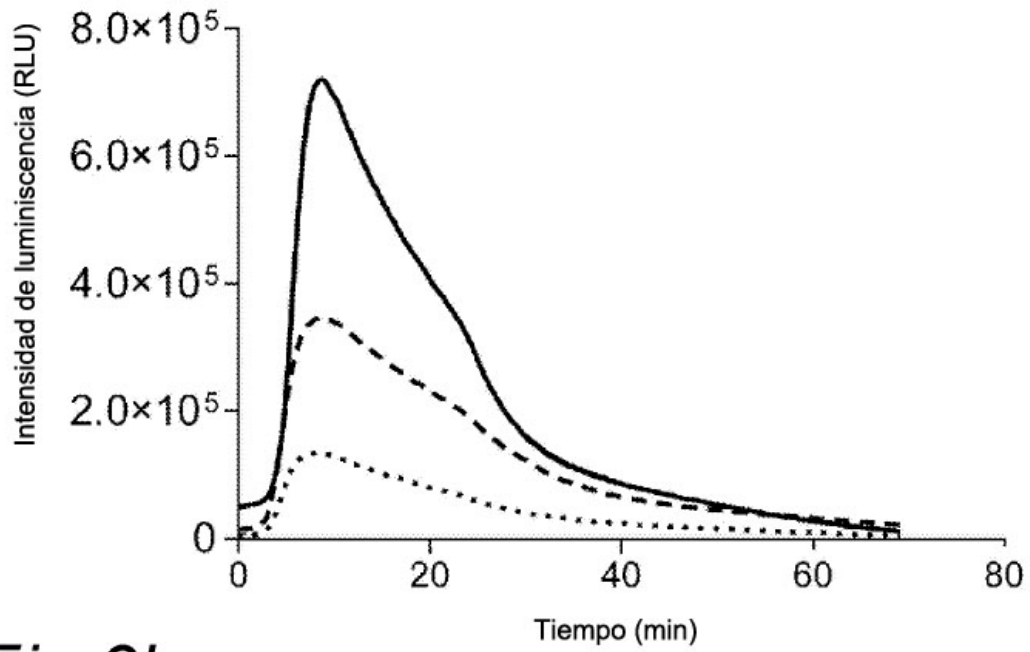
*Fig 2a*



*Fig 2b*



*Fig 3a*



*Fig 3b*

