

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 985**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/IB2012/054634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13035074**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12773125 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2753709**

54 Título: **Método para analizar plasminógeno en un medio líquido, composiciones asociadas y kit**

30 Prioridad:

07.09.2011 FR 1157948

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)
5-1, Wakinohama-Kaigandori 1-chome
Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

AMIRAL, JEAN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 627 985 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para analizar plasminógeno en un medio líquido, composiciones asociadas y kit

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere al campo de los métodos para analizar plasminógeno en una muestra, en particular por medio de reactivos líquidos, en particular por medio de reactivos listos para usarse que se pueden almacenar durante un largo periodo de tiempo.

10 Este tipo de análisis requiere una activación del plasminógeno de la muestra, lo cual generalmente se hace con estreptoquinasa.

15 En este contexto, una solución consiste en usar una estreptoquinasa con un activador de estreptoquinasa, el cual es fibrinógeno. Sin embargo, el fibrinógeno es difícil de conservar en forma líquida, dando como resultado resultados de análisis que se pueden modificar en función del tiempo de conservación de fibrinógeno.

Técnica anterior

20 Por tanto, para superar estas desventajas, el documento de Patente americana 5.879.923 revela una solución de plasmina estabilizada por oligopéptidos, aminoácidos determinados. Esta solución no es enteramente satisfactoria debido a que se limita a la estabilización de la solución de plasmina y no es adecuada para estabilizar la solución de activador de plasminógeno tal como fibrinógeno. Además, esta solución no es satisfactoria para un análisis del plasminógeno presente en la sangre de un paciente basado en reactivos líquidos listos para usarse preparados un largo tiempo antes de tomar la sangre del paciente.

30 Takada y col. (1985) describe el efecto de los activadores de estreptoquinasa fibrina, potenciador de SK, fibrinógeno y fragmentos D y E de fibrina, pero no DD de fibrina, sobre la activación del plasminógeno, pero no describen la estabilidad de dichos activadores durante un periodo de tiempo prolongado.

La solicitud de patente internacional WO 90/14102 se refiere a la estabilidad *in vivo* (en plasma) de complejos de activador de plasminógeno y fragmentos de fibrina, pero no dice nada respecto a la estabilidad de una composición que comprende estreptoquinasa y DD de fibrina.

35 **Descripción de la invención**

La invención se pretende que supere las desventajas de la técnica anterior y en particular proponga un método para analizar plasminógeno en una muestra que comprende las etapas de:

40 a- almacenar una composición que comprende una estreptoquinasa y un activador de estreptoquinasa en una solución lista para usarse
b- hacer reaccionar

45 i- la solución que comprende la composición que comprende la estreptoquinasa y el activador de estreptoquinasa,
ii- con una solución control o una muestra de plasma diluida,

50 c- hacer un seguimiento de dicha reacción usando medios para el seguimiento de la reacción (SPm),
d- determinar la cantidad de plasminógeno en la solución control o en la muestra de plasma diluida, en función del resultado del seguimiento de dicha reacción. En realizaciones particulares, los métodos consisten en las etapas anteriormente descritas.

55 Según la invención, el activador de estreptoquinasa usado en los métodos proporcionados en el presente documento es uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un fragmento DD de fibrina y/o un derivado de fragmento DD que comprende al menos los aminoácidos del fragmento DD implicados en la activación de la estreptoquinasa. Por fragmento DD (o dímero D), los inventores quieren decir un subfragmento de fibrina que contiene dos dominios D reticulados cada uno de una molécula de fibrinógeno diferente y que se puede obtener, por ejemplo, por lisis enzimática de fibrina.

60 Por tanto, el fragmento DD usado en esta invención puede venir de una fibrina o coágulo sanguíneo sometido a lisis. También es posible usar un fragmento DD recombinante. También se puede usar un fragmento DD no purificado, por ejemplo, una fracción de degradación de fibrina. Por derivado de fragmento DD, los inventores quieren decir una molécula que comprende al menos algo del fragmento DD como se definió anteriormente, en particular, los aminoácidos del fragmento DD implicados en la activación de la estreptoquinasa. En realizaciones particulares, el derivado tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con el fragmento DD, más particularmente al menos 80 %, lo más particularmente al menos 90 % o más de 95 % de identidad de secuencia con el fragmento DD.

En realizaciones particulares adicionales, el derivado del fragmento DD puede comprender, por ejemplo, más aminoácidos que el fragmento DD, e incluye, por ejemplo, el complejo dímero D /fragmento E.

5 El medio o compuesto para hacer el seguimiento de la reacción (SPm) puede ser, por ejemplo, una molécula injertada sobre un sustrato, sobre un producto enzimático formado por estreptoquinasa y el activador de estreptoquinasa, o sobre dicha enzima. Tal injerto se realiza, por ejemplo, por síntesis química. El medio para hacer el seguimiento de la reacción (SPm) también puede ser una molécula capaz de asociarse con un sustrato, con un producto de dicha enzima o con dicha enzima.

10 Los medios o compuestos para hacer el seguimiento se eligen para ser capaces de hacer el seguimiento de la reacción de dicha enzima, por ejemplo, generando o causando la desaparición de un color o fluorescencia o modificando la absorbancia del medio de reacción.

15 En realizaciones particulares, el compuesto para el seguimiento de la reacción es un sustrato cromogénico específico para plasmina y complejos de plasmina-estreptoquinasa. Ejemplos de tales compuestos son conocidos en la técnica, tal como, pero no se limitan a, S-2403™, S-2251™ vendido por Chromogenix y SPm41 vendido por la compañía Hyphen Biomed.

20 En realizaciones particulares, la reacción se puede realizar en presencia de un anticoagulante, preferentemente hirudina o cualquier otro inhibidor de trombina.

25 Ventajosamente, el método comprende, antes de la etapa de reacción a), una etapa de almacenaje del activador de estreptoquinasa en una solución lista para usarse. Por tanto, el método no requiere preparación de una solución activador de estreptoquinasa inmediatamente antes de usarse. Además, los activadores de estreptoquinasa son estables en solución y se pueden conservar, por ejemplo, con estreptoquinasa, sin alterar sus propiedades fisicoquímicas y su eficacia en la realización del análisis de plasminógeno. En realizaciones particulares, la estreptoquinasa y el activador de estreptoquinasa pueden estar empaquetados juntos.

30 En realizaciones particulares, la etapa de almacenaje del activador de estreptoquinasa se realiza a una temperatura de entre -20 °C y 37 °C. En realizaciones particulares, el activador de estreptoquinasa se almacena a entre 2 y 10 °C, más particularmente entre 4 y 8 °C. En realizaciones particulares, el activador de estreptoquinasa es adecuado para almacenaje a temperatura ambiente o no requiere de condiciones de almacenaje específicas.

35 Según una realización ventajosa, la etapa de almacenaje se realiza durante un periodo mayor de 12 horas, preferentemente entre 24 horas y 24 meses, en particular entre 24 horas y 18 meses.

Opcionalmente, el activador de estreptoquinasa se almacena en presencia de conservantes y/o antibióticos tales como ciprofloxacina.

40 Ventajosamente, el método también comprende una etapa de preincubación de la composición que comprende la estreptoquinasa (R1), y el activador de estreptoquinasa, a alrededor de 37 °C, dicha etapa se realiza antes de dicha etapa de reacción a).

45 Según una realización particular, la etapa de reacción a) se realiza alrededor de 37 °C, preferentemente durante alrededor de 3 a 6 minutos.

Según una realización particular, la etapa de reacción a) se realiza mediante una etapa de acidificación, preferentemente añadiendo ácido cítrico.

50 Un objetivo adicional de la invención concierne una composición para analizar el plasminógeno presente en una muestra, en el cual dicha composición comprende un anticoagulante, una estreptoquinasa y un activador de estreptoquinasa, caracterizado por que el activador de estreptoquinasa es uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en un fragmento DD de fibrina y/o al menos un derivado de fragmento DD que comprende al menos los aminoácidos del fragmento DD implicados en la activación de la estreptoquinasa.

55 En realizaciones particulares, la composición anteriormente descrita también comprende un anticoagulante, preferentemente hirudina.

60 En realizaciones particulares, la composición anteriormente descrita es una solución lista para usarse.

En realizaciones particulares, la composición que comprende el activador de estreptoquinasa comprende estreptoquinasa.

65 En realizaciones particulares, la composición es particularmente adecuada como solución lista para usarse. En realizaciones particulares, la composición comprende una solución de activador de estreptoquinasa a alrededor de

100 µg/ml o la cual se puede diluir fácilmente a una concentración de 100 µg/ml, tal como una concentración entre 100 µg/ml y 1 mg/ml. En realizaciones particulares, la composición no requiere más manipulaciones, incluyendo más diluciones, antes de usarse.

5 En realizaciones particulares, la composición no comprende fibrinógeno. En realizaciones más particulares, las composiciones comprenden un fragmento DD y/o uno o más derivados de fragmento DD, y no comprenden otro activador de estreptoquinasa. En realizaciones particulares adicionales, las composiciones comprenden solamente un activador de estreptoquinasa, más particularmente un fragmento DD y/o uno o más derivados de fragmento DD.

10 La invención también se refiere a un kit para analizar plasminógeno en una muestra que comprende una composición descrita según una o más de las anteriores realizaciones.

Ventajosamente, el kit para analizar anteriormente descrito se configura para poner en práctica el método anteriormente descrito.

15 En particular, la invención se refiere a un kit para analizar plasminógeno en una muestra que comprende una composición que comprende una estreptoquinasa y un activador de estreptoquinasa, y un medio para hacer el seguimiento (SPm) de una reacción entre estreptoquinasa, el activador de estreptoquinasa y una muestra de plasma diluida, en el cual el activador de estreptoquinasa es uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste
20 en un fragmento DD de fibrina y/o al menos un derivado de fragmento DD funcional. Más particularmente, los kits específicos se prevén para el uso *in vitro*. Esto implica que los reactivos son adecuados para su uso *in vitro* y pueden comprender reactivos, tales como conservantes que no son compatibles para su uso *in vivo*.

25 En realizaciones particulares, la estreptoquinasa y el activador de estreptoquinasa están empaquetados juntos en el kit. En realizaciones particulares adicionales, la solución de estreptoquinasa en el kit es particularmente apropiada para su uso a aproximadamente 12.500 a 15.000 UI/ml.

30 En realizaciones particulares, el kit para analizar se caracteriza por al menos una composición calibrada en volumen y cantidad para hacerse reaccionar con la solución control o la muestra de plasma diluida, sobre la base del seguimiento de la reacción entre la enzima y el sustrato.

35 Por ejemplo, las composiciones del kit se eligen de manera que un volumen de la composición de estreptoquinasa y activador de estreptoquinasa se mezcla con un volumen de una solución control o una muestra de plasma diluida. En realizaciones particulares, las composiciones del kit se eligen de manera que la solución de estreptoquinasa contiene aproximadamente 12.500 a 15.000 UI/ml. En realizaciones particulares, la solución de activador de estreptoquinasa contiene aproximadamente 100 µg/ml.

40 Un objetivo adicional de la invención consiste en un uso de una composición que comprende una estreptoquinasa y un activador de estreptoquinasa para analizar plasminógeno en una muestra, con el activador de estreptoquinasa que es seleccionado del grupo que consiste en un fragmento DD de fibrina y/o al menos un derivado de fragmento DD funcional.

Breve descripción de las figuras

45 Características adicionales, detalles y ventajas llegarán a estar claros a partir de la siguiente descripción, en referencia a las figuras adjuntas, que muestran:

- la figura 1 proporciona un diagrama general del método según realizaciones particulares de la invención;
- la figura 2 proporciona una curva de calibración en ensayos de sustitución de fibrinógeno;
- 50 - la figura 3 proporciona una curva de calibración en ensayos ilustrativos con diferentes concentraciones de fragmento DD de fibrina;
- la figura 4 proporciona curvas para determinar la cantidad óptima de estreptoquinasa en realizaciones ilustrativas;
- la figura 5 ilustra la estabilidad de un reactivo R1 ilustrativo que comprende el fragmento DD (A) o, como
55 comparación, fibrinógeno (B), tras la incubación en un baño de agua a 30 °C.

Para mayor claridad, se indican elementos idénticos o similares mediante las mismas señales de referencia en todas las figuras.

60 Descripción detallada de las realizaciones de la invención

En referencia a la figura 1, la realización del método según un modo preferido se basa en composiciones de reactivos R1 y R2, que, por ejemplo, se almacenan en forma de líquido listo para usarse LRT.

65 La primera composición de reactivo R1 comprende el fragmento DD. DD se obtiene por coagulación de fibrinógeno a fibrina con trombina para obtener un coágulo, el cual, a continuación, se degrada por tPA en presencia de

5 plasminógeno, para generar productos de degradación de fibrina; el Dímero D además se purifica usando cromatografía de intercambio iónico y si se requiere una cromatografía de filtración en gel complementaria. El fragmento DD se proporciona en la primera composición de reactivo R1 en una concentración preferentemente alrededor de 0,1 mg/ml; se prefiere una matriz base que comprende Tris, Na₂EDTA, NaCl y BSA, pero se pueden usar otras matrices bases. Para un ensayo de la calidad, preferentemente se usa un fragmento DD denominado "libre de Plg" ("Plg-free"), es decir, que comprende plasminógeno en un estado de traza, o preferentemente no plasminógeno.

10 La primera composición de reactivo R1 también comprende al menos un conservante, preferentemente ciprofloxacina, azida de sodio a 0,9 g/l e hirudina a 0,25 UAT/ml.

Finalmente, la primera composición de reactivo R1 comprende estreptoquinasa. Como se indicó anteriormente, lo más particularmente el activador de estreptoquinasa es un dímero D de fibrina.

15 La segunda composición de reactivo R2 comprende un sustrato sintético SPm41 vendido por la compañía Hyphen Biomed, que libera paranitroanilina en presencia de plasminógeno (plg), estreptoquinasa y fibrinógeno (o fragmento DD). R2 también puede comprender otro sustrato del que la interacción con la enzima (en este caso, el complejo plasminógeno-estreptoquinasa) modifica la absorbancia o la fluorescencia del medio de reacción.

20 Preferentemente, la segunda composición de reactivo R2 está tamponada con un pH ácido, preferentemente por medio de ácido tartárico.

25 En una etapa (ai-aii), un volumen de la primera composición de reactivo R1 se mezcla con un volumen de solución control (cal) o muestra de plasma diluida (Sam), y la mezcla se incuba durante 3 minutos, a 37 °C.

En una etapa (aiii), un volumen de la segunda composición de reactivo R2 se añade a esta mezcla y se mezcla y se incuba durante 3 minutos a 37 °C.

30 A continuación, en una etapa (b), se observa el cambio en la reacción mediante la modificación en la absorbancia o densidad óptica (DO) correlacionadas con el consumo del sustrato, en este caso SPm41. En el caso de SPm41, se mide la absorbancia a 405 nm.

35 La variación en absorbancia (DO) hace que sea posible determinar, en una etapa (c), el contenido de plasminógeno (% plg), por ejemplo, por medio de una curva de calibración.

A continuación, la reacción preferentemente se para en una etapa (d), por ejemplo, añadiendo un volumen de ácido cítrico (H⁺) a 20 g/l.

40 Los ensayos de análisis de plasminógeno comparativos se han conducido con fibrinógeno (+fbg) según la técnica anterior, sin fibrinógeno (-fbg), o con sustitutos de fibrinógeno usando derivados de fibrina, según la tabla 1 de a continuación:

Tabla 1: ensayos con sustitutos de fibrinógeno:

Método manual (WB)	-fbg	+fbg a 0,7 mg/ml	con un fragmento FFE a 0,05 mg/ml	con un fragmento FE a 0,05 mg/ml	con un fragmento FD a 0,10 mg/ml	con un fragmento DD a 0,10 mg/ml
% Plg	DO (a 405 nm)					
C (1/20 150 %)	0,743	1,577	0,755	0,729	0,825	1,977
C:2	0,298	0,742	0,291	0,271	0,304	0,991
C:4	0,113	0,333	0,115	0,114	0,121	0,473
C:8	0,047	0,152	0,049	0,047	0,053	0,210
0	0,003	0,010	0,001	0,005	0,005	0,006
r2 (lin-lin)	0,985	0,9976	0,9828	0,9792	0,9775	0,9995

45 En la tabla 1, la línea C corresponde a una composición de calibración con una dilución de 1/20 para una concentración de plasminógeno de 150 %. La línea C:2 corresponde a una composición de calibración con una dilución de la mitad de la línea C, etc. y así hasta la línea C:8. La línea 0 corresponde a una composición de calibración con una concentración de plasminógeno de 0 %. La línea r2 corresponde al cuadrado del coeficiente de correlación lineal de las curvas de calibración.

50 Las curvas de calibración de la figura 2 corresponden a los resultados de la anterior tabla 1. Las coordenadas "y" corresponden a los valores de densidad óptica (DO) a 405 nm, y las coordenadas "x" corresponden al contenido de plasminógeno (% plg). Estas curvas tienen referencias relacionadas con la presencia (+fbg) o la ausencia (-fbg) de fibrinógeno, o con los diferentes sustitutos ensayados (FFE, FE, FD, DD) a las concentraciones mencionadas en la

tabla 1.

Como se ve en la figura 2, la curva de calibración correspondiente al ensayo sin fibrinógeno (-fbg) básicamente se superpone con aquellas de los ensayos de sustitución de fibrinógeno con fragmentos FFE, FE, FD de fibrina.

Sorprendentemente, está claro a partir de la figura 2 y la tabla 1 que la curva (+DD) correspondiente al fragmento DD de fibrina parece ser de mayor calidad que la curva correspondiente al fibrinógeno entero (+fbg). De hecho, el coeficiente r2 es 0,9995 para DD en comparación con 0,9976 para la muestra (+fbg), lo cual significa mejor linealidad. Además, la curva de DD está por encima de la curva de +fbg, lo cual significa una DO mayor y, por lo tanto, una cuantificación más exacta del contenido de plasminógeno.

También se realizaron ensayos para determinar el contenido de fragmento DD óptimo, según la tabla 2 de a continuación:

Tabla 2: Ensayos con diferentes contenidos de fragmento DD:

Método manual (WB)	DD a 500 µg/ml	DD a 200 µg/ml	DD a 100 µg/ml	DD a 50 µg/ml	DD a 25 µg/ml
% Plg:	DO (a 405 nm)				
C (dilución 1/20 = 150 %)	2,246	2,125	2,003	1,723	1,433
C:2	1,185	1,132	0,998	0,822	0,640
C:4	0,592	0,560	0,467	0,368	0,257
C:8	0,284	0,264	0,209	0,156	0,112
0	0,001	0,002	0,000	0,000	0,000
r2 (lin-lin)	0,9991	0,9987	0,9995	0,9983	0,9941

Las curvas de calibración de la figura 3 corresponden a los resultados de la anterior tabla 2. Las coordenadas “y” corresponden a los valores de la densidad óptica (DO) a 405 nm, y las coordenadas “x” corresponden al contenido de plasminógeno (% plg). Por tanto, las curvas correspondientes a la tabla 2 tienen referencias relacionadas con la concentración, en µg/ml, del fragmento DD de fibrina en los diferentes ensayos.

Como se ve en la figura 3 y la tabla 2, un contenido de fragmento DD de 100 µg/ml es suficiente para optimizar el análisis de plasminógeno. De hecho, con un r2 de 0,9995, la linealidad es satisfactoria y la curva está en una posición intermedia con respecto a las correspondientes a las otras concentraciones de fragmento DD.

Además, los ensayos se condujeron para determinar el contenido de estreptoquinasa óptimo en las siguientes dos muestras R1: una con fibrinógeno a 0,7 mg/ml de la cual los resultados se muestran en la tabla 3; y la otra con 100 µg/ml de fragmento DD de la cual los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 3: estreptoquinasa óptima con 0,7 mg/ml de fibrinógeno:

R1 con 0,7 mg/ml de fibrinógeno/R2							
[estreptoquinasa] UI/ml	% plasminógeno					r2 (lin/lin)	ΔDO (150-0 %)
	150	75	37,5	18,75	0		
0	0,044	0,024	0,015	0,010	0,002	0,9944	0,042
5.000	1,357	0,597	0,273	0,125	0,023	0,9933	1,334
7.500	1,581	0,720	0,333	0,157	0,017	0,9963	1,564
10.000	1,697	0,788	0,360	0,175	0,012	0,9974	1,685
12.500	1,771	0,843	0,400	0,195	0,016	0,9986	1,755
20.000	1,860	0,926	0,455	0,208	0,012	0,9997	1,848
30.000	1,877	0,94	0,470	0,234	0,015	0,9999	1,862

Después del análisis de la curva de cambio de absorbancia en función de la concentración de estreptoquinasa (no mostrado) correspondiente a la tabla 3, se indica que, en la muestra R1 con 0,7 mg/ml de fibrinógeno, se puede observar un aplanamiento que comienza con una concentración de estreptoquinasa de alrededor de 20.000 UI/ml. En la tabla 3, de hecho se observa un ΔDO (150-0 %) de 1,848 para la línea (20.000 UI/ml) y 1,862 para la línea (30.000 UI/ml). Por tanto, la concentración de estreptoquinasa óptima se estima a 20.000 UI/ml, el valor al cual la DO significativamente no se incrementa más.

Tabla 4: Estreptoquinasa óptima con 100 µg/ml de fragmento DD:

R1 con 100 µg/ml de fragmento DD/R2							
[estreptoquinasa] UI/ml	% plasminógeno					R2 (lin/lin)	ΔDO (150-0 %)
	150	75	37,5	18,75	0		
0	0,037	0,014	0,006	0,008	0	0,9552	0,037
5.000	1,846	0,868	0,386	0,157	0	0,9977	1,846

R1 con 100 µg/ml de fragmento DD/R2							
[estreptoquinasa] UI/ml	% plasminógeno					R2 (lin/lin)	ΔDO (150-0 %)
	150	75	37,5	18,75	0		
7.500	1,891	0,915	0,418	0,179	0	0,9991	1,891
10.000	1,956	0,959	0,444	0,194	0,002	0,9992	1,954
12.500	1,986	0,971	0,462	0,207	0	0,9995	1,986
20.000	1,979	0,982	0,467	0,222	0	0,9998	1,979
30.000	1,961	0,967	0,47	0,219	0	0,9998	1,961

Como se ve en las curvas de cambio de absorbancia (DO) en función de la concentración de estreptoquinasa ([Estrept] en UI/ml) mostradas en la figura 4, y correspondientes a la tabla 4, se puede observar un comienzo de saturación de las curvas empezando con una concentración de estreptoquinasa de 5.000 UI/ml. Se puede observar un aplanamiento más claramente en la figura 4 entre 12.500/15.000 UI/ml. En paralelo, en la tabla 4, se indica un ΔDO (150-0 %) de 1,954 y 1,986 para las líneas (12.500 y 15.000 UI/ml) y 1,961 para la línea (30.000 UI/ml). Por tanto, la concentración de estreptoquinasa óptima se estima a entre 12.500 y 15.000 UI/ml, preferentemente a 15.000 UI/ml.

10 Sorprendentemente, está claro a partir de la tabla 4 y la figura 4 que cuando se usa el fragmento DD, es necesario menos estreptoquinasa (12.500 a 15.000 UI/ml para la muestra +DD en comparación con 20.000 para la muestra +fbg) y se obtienen mejores resultados que con el fibrinógeno entero. De hecho, la saturación de la DO comienza a concentraciones de estreptoquinasa inferiores (5.000 UI/ml).

15 Además, se investigó la estabilidad de la composición de reactivo R1 que comprende fragmento DD. Para este fin, se usaron una composición de reactivo R1 que comprende el fragmento DD a una concentración de 0,1 mg/ml, Estreptoquinasa a 10.000 UI/ml y una composición de reactivo R2 que comprende el sustrato SPM41 a una concentración de 2,25 mg/ml en los métodos anteriormente descritos. 200 µl de una muestra con concentraciones variantes (obtenidas de una dilución de 1/30 correspondiente a una concentración de 100 %) se mezclaron con 200 µl de la composición de reactivo R1 y se incubaron durante 3 minutos a 37 °C. A continuación, se añaden 200 µl de la composición de reactivo R2 y la mezcla se incubó de nuevo durante 3 minutos a 37 °C. A continuación, la reacción se para usando 200 µl de ácido cítrico al 2 %.

25 El ensayo se realizó en diferentes momentos durante 3 meses de tiempo, por lo cual los reactivos se mantienen a temperatura ambiente.

Los resultados se ilustran en la Tabla 5.

Tabla 5: reproductibilidad del análisis durante 3 meses de tiempo

Tiempo	% plasminógeno					r2 (lin/lin)	DO (150/0)
	150	75	37,5	18,75	0		
	1/20	1/40	1/80	1/160	0		
T0	2,500	1,251	0,579	0,261	0	0,9994	2,500
T0 + 1 semana	2,858	1,537	0,711	0,346	0	0,9981	2,858
T0 + 2 semanas	2,776	1,430	0,638	0,257	0	0,9982	2,776
T0 + 3 semanas	2,329	1,302	0,625	0,299	0	0,9964	2,329
T0 + 1 mes	2,698	1,384	0,620	0,229	0	0,9978	2,698
T0 + 2 meses	2,693	1,314	0,628	0,238	0	0,9997	2,693
T0 + 3 meses	2,532	1,276	0,626	0,25	0,007	0,9991	2,525

30 Mientras los resultados obtenidos a 150 % muestran alguna variabilidad debido a la implicación de diferentes técnicos en diferentes momentos, es evidente a partir de estos datos que la composición de reactivo R1 es estable a temperatura ambiente durante periodos de tiempo prolongados y dará como resultado resultados comparables cuando se usa durante un periodo de tiempo de 3 meses.

35 Igualmente, la estabilidad de la composición de reactivo R1 se consideró tras la conservación a 30 °C en un baño de agua. Los datos se proporcionan en la Tabla 6 de a continuación. Otras condiciones experimentales eran como se describieron anteriormente.

40 Tabla 6. Conservación a 30 °C de la composición de reactivo R1 que comprende fragmento DD

Tiempo	% plasminógeno					r2 (lin/lin)	ΔDO (150/0)
	150	75	37,5	18,75	0		
	1/20	1/40	1/80	1/160	0		
T0 (11/08/11)	2,500	1,251	0,579	0,261	0	0,9994	2,500
T0 + 1 semana +30 °C	2,632	1,293	0,530	0,165	0	0,9957	2,632
T0 + 2 semanas +30 °C	2,655	1,335	0,564	0,211	0	0,9973	2,655

Tiempo	% plasminógeno					r2 (lin/lin)	ΔDO (150/0)
	150	75	37,5	18,75	0		
	1/20	1/40	1/80	1/160	0		
T0 + 3 semanas +30 °C	2,424	1,232	0,570	0,264	0	0,9992	2,424
T0 + 4 semanas +30 °C	2,554	1,196	0,497	0,191	0	0,9963	2,554

Estos datos se ilustran en la Figura 5A.

5 Se realizó un experimento similar usando una composición de reactivo R1 que comprendía fibrinógeno a 0,7 mg/ml, y estreptoquinasa a 11.000 UI/ml. La composición de reactivo R2 y las condiciones experimentales son como se describieron anteriormente. La incubación de R1 era a 30 °C en un baño de agua. Los datos se proporcionan en la Tabla 7 de a continuación y la Figura 5B.

10 Tabla 7. Conservación a 30 °C de la composición de reactivo R1 que comprende fibrinógeno

Tiempo	% plasminógeno					r2 (lin/lin)	ΔDO (150/0)
	150	75	37,5	18,75	0		
	1/20	1/40	1/80	1/160	0		
T0 (21/04/11)	1,828	0,895	0,425	0,192	0,008	0,999	1,820
T0 + 1 semana (FB)	1,479	0,681	0,306	0,128	0,000	0,997	1,479
T0 + 2 semanas	1,513	0,684	0,296	0,121	0,000	0,996	1,513
T0 + 3 semanas	1,387	0,637	0,274	**	**	**	**
** carece de sustrato							

15 Estos datos demuestran que hay considerable variabilidad de determinación de DO usando R1 mantenido a 30 °C. Sin ir más allá del alcance de la invención, un experto en la técnica puede adaptar el método de la invención a un análisis basado en uroquinasa en lugar de estreptoquinasa, con un correspondiente activador, preferentemente un activador de uroquinasa elegido entre fragmentos de fibrina.

REIVINDICACIONES

1. Método para analizar plasminógeno en una muestra que comprende las etapas que consisten en:

- 5 a- almacenar una composición que comprende una estreptoquinasa y un activador de estreptoquinasa en una solución lista para usarse,
- b- hacer reaccionar
 - 10 i- la solución que comprende la composición que comprende la estreptoquinasa, y el activador de estreptoquinasa,
 - ii- con una solución control o una muestra de plasma diluida,
- c- hacer un seguimiento de dicha reacción usando medios para el seguimiento de la reacción,
- 15 d- determinar la cantidad de plasminógeno en la solución control o en la muestra de plasma diluida, en función del resultado del seguimiento de dicha reacción,

en donde el método se **caracteriza por que** el activador de estreptoquinasa se selecciona del grupo que comprende un fragmento DD de fibrina y/o al menos un derivado de fragmento DD que comprende al menos los aminoácidos del fragmento DD implicados en la activación de estreptoquinasa.

20 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la etapa de reacción a) se realiza en presencia de un anticoagulante, preferentemente hirudina.

25 3. Método según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** la etapa de almacenaje se realiza a una temperatura de entre -20 °C y 37 °C.

4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la etapa de almacenaje se realiza durante un periodo mayor de 12 horas, preferentemente entre 24 horas y 24 meses, en particular entre 24 horas y 18 meses.

30 5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** también comprende una etapa de preincubación de la composición que comprende la estreptoquinasa y el activador de estreptoquinasa, a alrededor de 37 °C, antes de dicha etapa de reacción b).

35 6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** la etapa de reacción b) se realiza a alrededor de 37 °C, preferentemente durante alrededor de 3 a 6 minutos.

40 7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** la etapa de reacción b) se para mediante una etapa de acidificación, preferentemente añadiendo ácido cítrico.

8. Composición para analizar el plasminógeno presente en una muestra, en la cual dicha composición comprende un anticoagulante, una estreptoquinasa y un activador de estreptoquinasa, **caracterizada por que** el activador de estreptoquinasa se selecciona del grupo que comprende un fragmento DD de fibrina y/o al menos un derivado de fragmento DD que comprende al menos los aminoácidos del fragmento DD implicados en la activación de la estreptoquinasa.

9. Composición según la reivindicación 8, **caracterizada por que** dicho anticoagulante es hirudina.

50 10. Composición según la reivindicación 8 o 9, **caracterizada por que** está en una solución lista para usarse.

11. Kit para analizar plasminógeno en una muestra *in vitro* que comprende una primera composición de reactivo que comprende:

- 55 - una estreptoquinasa, y un activador de estreptoquinasa seleccionado del grupo que comprende un fragmento DD de fibrina y/o al menos un derivado de fragmento DD funcional; y
- un medio para hacer el seguimiento de la reacción entre estreptoquinasa, el activador de estreptoquinasa y una muestra de plasma diluida.

60 12. Kit para analizar según la reivindicación 11, en donde dicho medio para hacer el seguimiento se proporciona como una segunda composición de reactivo que comprende un sustrato cromogénico específico para plasmina y complejos de plasmina-estreptoquinasa.

13. Kit para analizar según la reivindicación 11 o 12, en donde dicha primera composición de reactivo comprende además un anticoagulante.

65

14. Uso de la composición que comprende un activador de estreptoquinasa y estreptoquinasa para analizar plasminógeno en una muestra de plasma, **caracterizado por que** el activador de estreptoquinasa se selecciona del grupo que comprende un fragmento DD de fibrina y/o al menos un derivado de fragmento DD que comprende al menos los aminoácidos del fragmento DD implicados en la activación de la estreptoquinasa.

5

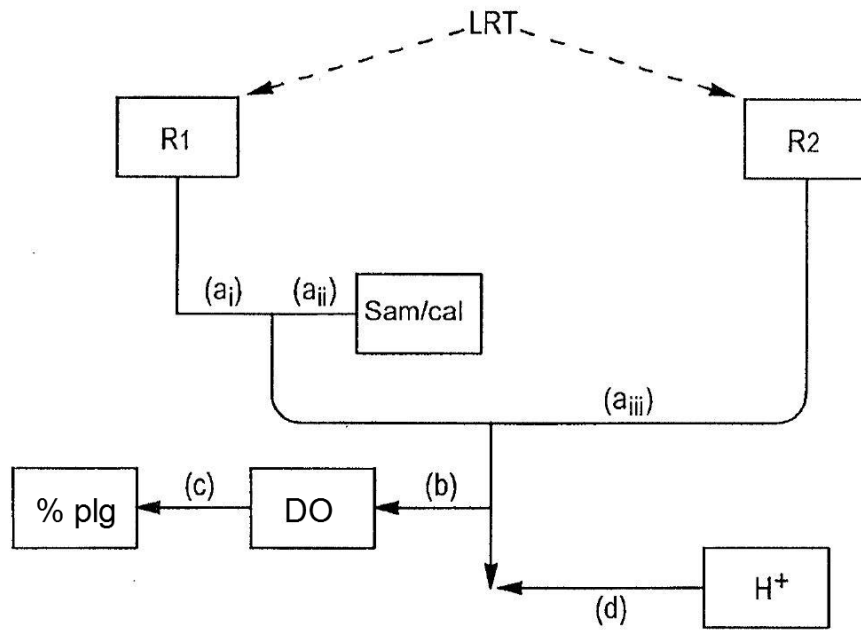


Figura 1

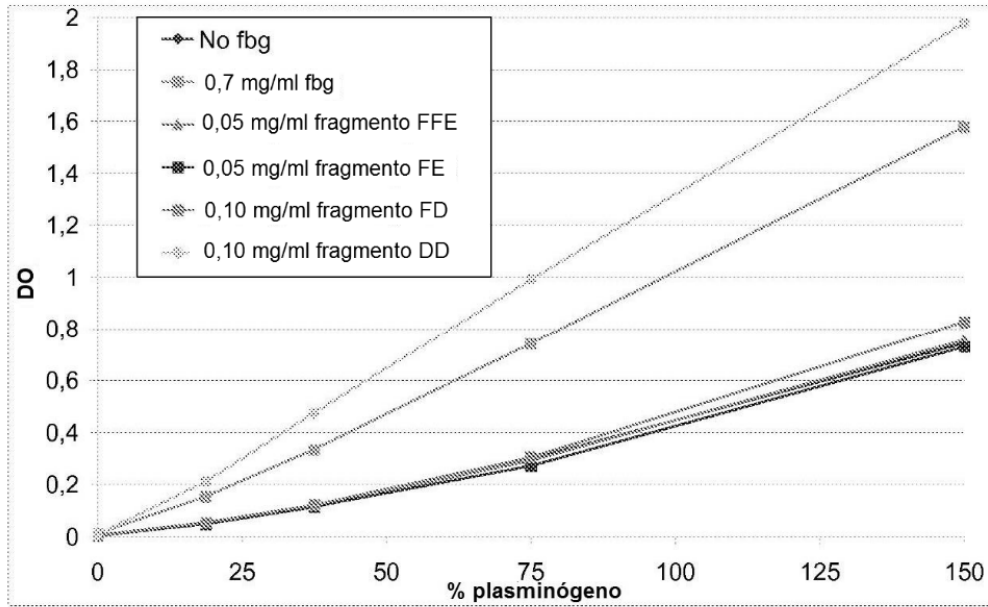


Figura 2

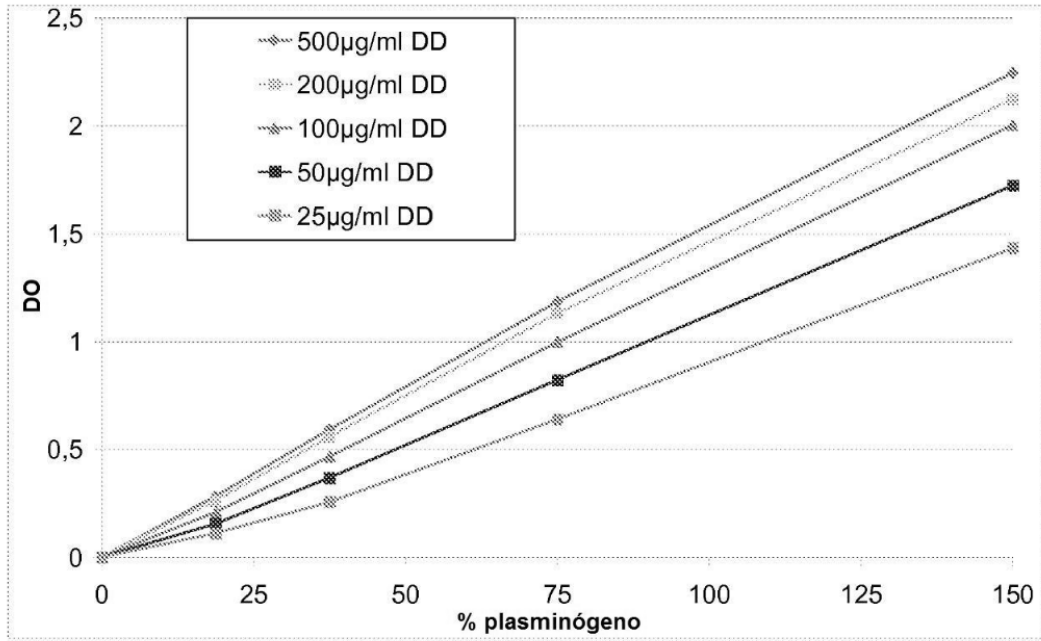


Figura 3

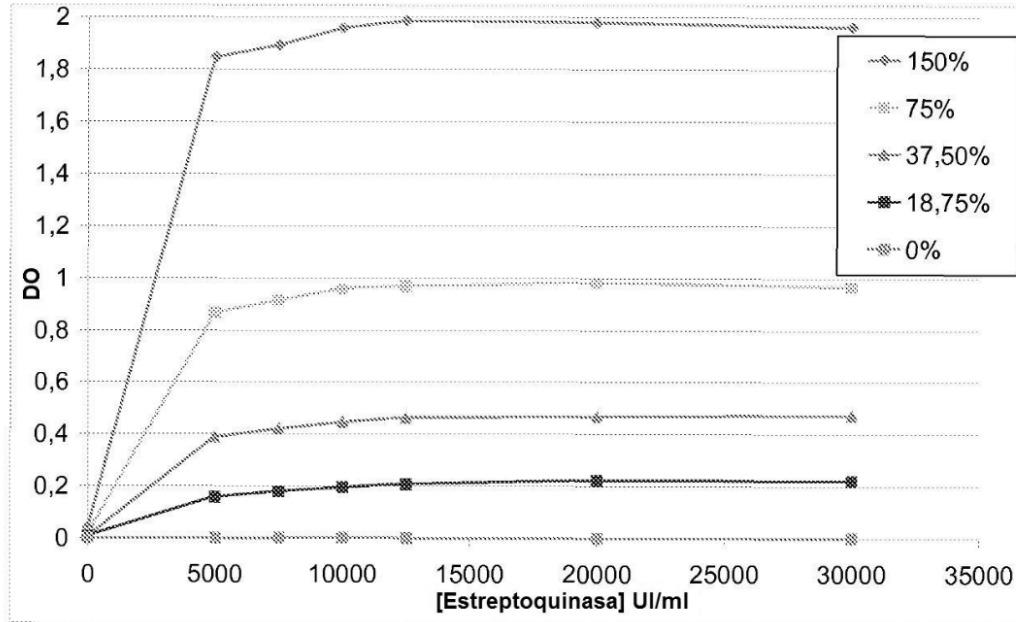


Figura 4

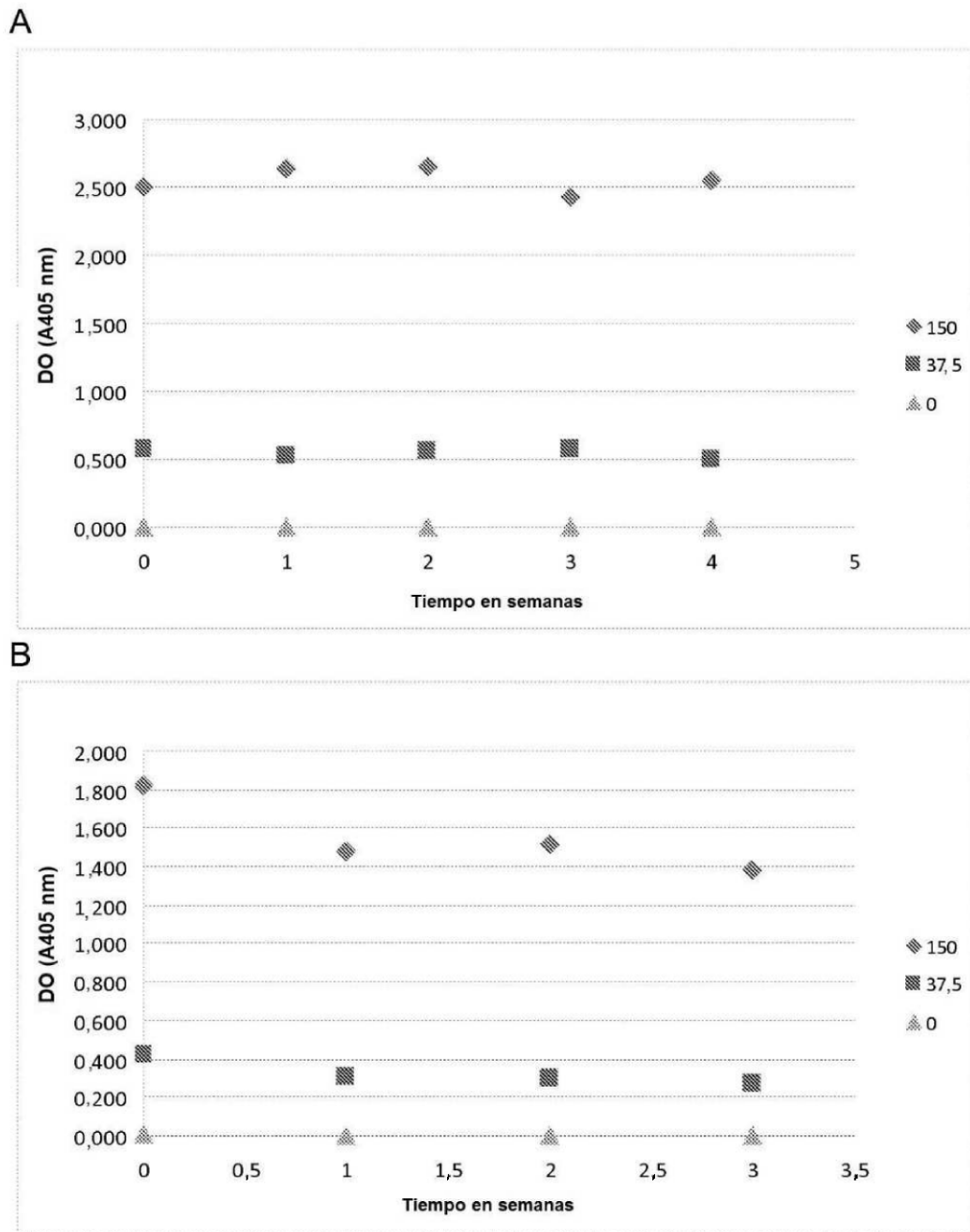


Figura 5