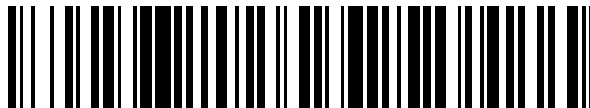


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 574**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012 PCT/EP2012/002540**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175183**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12732787 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2723886**

54 Título: **Determinación de inhibidores de trombina directos en suero u orina**

30 Prioridad:

22.06.2011 GB 201110502

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

03.11.2017

73 Titular/es:

**DOASENSE GMBH (100.0%)
Waldhofer Strasse 102
69123 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**HARENBERG, JOB y
KRÄMER, ROLAND**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 640 574 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

Determinación de inhibidores de trombina directos en suero u orina

La presente invención se refiere a un método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra de suero u orina, que comprende la etapa de mezclar una muestra que contiene un inhibidor de trombina con una composición que contiene trombina bajo condiciones que permitan que la trombina libere una sustancia detectable de un sustrato.

Las pruebas de coagulación de sangre se efectúan sobre muestras de plasma procedentes de seres humanos/animales al hacer a las muestras de sangre incoagulables con citrato sódico (relación en volumen sangre/anticoagulante 9:1). Para realizar la determinación de valores de medida individuales de la coagulación sanguínea, la sangre se centrifuga y las células (en el sedimento) se separan de los componentes líquidos de la sangre (plasma). Para medir el tiempo de coagulación de plasma, se añaden al plasma cloruro cálcico y un activador de la coagulación. En métodos especiales para determinar factores de coagulación o inhibidores exógenos individuales, se usa una prueba fotométrica. En estos métodos, el colorante para-nitroanilina es liberado por una enzima de coagulación añadida exógenamente (p. ej. trombina) de un sustrato cromogénico (hidrocloruro de Bencil-Isoleucina-Glutamina-Glicina-Arginina-para-nitroanilina, Tosil-Glicina-Prolina-Arginina-para-nitroanilina, rodamina 110, bis-p-tosil-L-glicil-L-prolil-L-argininamida (Zweig SE et al., Membrane based, dry-reagent prothrombin time test, Biomed Instrum Technol (1996) 30:245-256) y otros), midiéndose la actividad/concentración de inhibidores de trombina o sustancias que inhiben trombina de un modo dependiente de la concentración. El resultado es una disminución lineal o sigmoidea de la liberación de para-nitroanilina, medida a 405 nanómetros en el fotómetro, dependiendo de la concentración del inhibidor de trombina (Gray E, Harenberg J. Collaborative study on monitoring methods to determine direct thrombin inhibitors lepirudin and argatroban. ISTH Control of Anticoagulation SSC Working Group on Thrombin Inhibitor. Journal of Thrombosis and Haemostasis. Sep 2005; 3(9): 2096-7).

Si se pretende analizar otros parámetros además de la coagulación sanguínea, tales como parámetros de función renal o hepática, electrolitos o colesterol, la sangre se coagula mediante la adición de un activador (p. ej. caolín). Aquí, se usan proteínas de coagulación, antitrombina y fibrinógeno. Estos factores se mezclan con células sanguíneas en un trombo sanguíneo en el coagulo en un tubo de coagulación, en el que se extrae sangre. El suero se puede encontrar en el sobrenadante, que no contiene estas proteínas de coagulación. La medida de estos parámetros clínicos-químicos es más fácil en suero. Las concentraciones de fármacos se miden también en suero, excepto para los fármacos de coagulación para uso clínico.

Las heparinas, las heparinas de bajo peso molecular, los heparinoides, el fondaparinux y otros polisacáridos necesitan cofactores en la sangre (antitrombina, cofactor de heparina II) para activar su efecto anticoagulante hacia enzimas de coagulación tales como trombina. Estos cofactores están presentes en plasma, de modo que se usan muestras de plasma con citrato para analizar la actividad de los inhibidores de la coagulación sanguínea. No son posibles pruebas en suero con métodos para la práctica clínica habitual (Harenberg J, Neue Antikoagulantien. Zett Verlag, Steinen, 2007).

Los inhibidores de trombina directos no necesitan cofactores en la sangre para hacerse activos. Estos son los llamados inhibidores de coagulación directos de enzimas de coagulación. Los más importantes por el momento son el grupo de inhibidores de trombina e inhibidores de trombina directos. Su actividad/concentración se mide en plasma con citrato con diferentes métodos/activadores. El dabigatrán es el segundo de los inhibidores de trombina directos orales en ser usados clínicamente. El ximelagatrán, el primer inhibidor de trombina directo oral, se ha retirado del mercado debido a varias intolerancias en pacientes. Están publicados los métodos de determinación pertinentes para detectar la concentración/actividad de dabigatrán. Todos los análisis se realizan con plasma anticoagulado con citrato (Stangier J, et al. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. Br J Clin Pharmacol. 2007;64:292-303).

La determinación de la concentración de dabigatrán adopta la cromatografía de líquidos de alta presión, un método que no puede ser adoptado para la práctica clínica habitual.

Hasta ahora, no ha habido métodos de detección en la práctica clínica-química habitual para inhibidores de la coagulación sanguínea a partir de suero. El suero tiene diferentes ventajas sobre el plasma: En medicina, las muestras de suero se recogen más a menudo de los pacientes que las muestras de plasma. La extracción de sangre es menos sensible a influencias para las muestras de suero que para las muestras de plasma. En el caso de una "mala" extracción de sangre, se puede activar la coagulación de sangre. Por lo tanto, los resultados están influenciados por los factores de coagulación. Esto no es posible para muestras de suero, ya que se produce una coagulación de sangre en el tubo después de la extracción.

Las soluciones actuales tienen la desventaja de requerir una extracción de sangre separada para obtener muestras de plasma para el análisis. Trombina y otras proteínas de coagulación están contenidas en el plasma de los pacientes en diferentes cantidades. Esto influye en el resultado del ensayo. Una extracción de sangre implica el riesgo de efectos secundarios locales, tales como hematoma, o efectos secundarios generalizados, tales como inflamación de la vena o transmisión de infección (p. ej. hepatitis, VIH).

5 En este contexto, Castellone y Van Cott (Castellone, D. D. y Van Cott, E. M.; Laboratory monitoring of new anticoagulants; Americal Journal of Hematology, 85; 2010; pp. 185-187) describe medios y métodos para el control de diversos fármacos anticoagulantes. Además, Lison y Spannagl (Lison, S. y Spannagl, M.; Monitoring of direct anticoagulants; Wien. Med. Wochenschr., 161, 3-4; 2011; pp. 58- 62) describe medios y métodos para el control de anticoagulantes directos.

Así, el problema subyacente a la presente invención es proporcionar nuevos medios para una detección eficaz de inhibidores de trombina que venzan las desventajas de los protocolos conocidos en la técnica.

La solución al problema técnico anterior se consigue mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

10 En particular, la presente invención se refiere a un método in vitro para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una muestra que contiene al menos un inhibidor de trombina directo;

(b) proporcionar una composición que contiene trombina;

15 (c) proporcionar una composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable, en donde el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable se puede escindir mediante trombina, de modo que la sustancia detectable se libere del sustrato cromogénico;

(d) mezclar la muestra de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) y la composición de la etapa (c) bajo condiciones que permitan la unión del al menos un inhibidor de trombina directo a trombina y que permitan que la trombina libere la sustancia detectable del sustrato cromogénico;

20 (e) medir la cantidad de sustancia detectable liberada,

en donde la muestra no contiene plasma sanguíneo citratado,

en donde la muestra contiene un fluido sanguíneo seleccionado del grupo que consiste en suero y orina, y

en donde el inhibidor de trombina se selecciona del grupo que consiste en dabigatrán, ximelagatrán y argatrobán.

25 Según la presente invención, al término "trombina" no subyace una restricción específica y puede incluir cualquier trombina activada obtenida de una fuente natural o a través de tecnología de ADN recombinante, o un derivado biológicamente activo de la misma.

30 Según se usa en la presente memoria, el término "derivado biológicamente activo" incluye cualquier derivado de una proteína, un complejo proteínico o un polipéptido que tiene sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de la trombina tales como propiedades de unión, y/o la misma base estructural, tal como una cadena principal peptídica. Las secuencias polipeptídicas de los derivados funcionalmente activos pueden contener eliminaciones, adiciones y/o sustitución de aminoácidos cuya ausencia, presencia y/o sustitución, respectivamente, no tienen ningún impacto negativo sustancial sobre la actividad del polipéptido, p. ej. aminoácidos que están situados en una parte de la secuencia polipeptídica que no contribuye a la actividad biológica de la proteína. Eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos secundarias de las secuencias polipeptídicas que no alteran la actividad biológica de dicho polipéptido también se incluyen en la presente solicitud como derivados biológicamente activos.

35 Una trombina obtenida de una fuente natural puede ser cualquier trombina aislada de un producto sanguíneo derivado de un mamífero. En una realización preferida de la presente solicitud, el mamífero se selecciona del grupo que consiste en ratón, ser humano, rata, gato, perro y mono. En una realización particularmente preferida, la trombina se aísla de un producto sanguíneo de un ser humano. En una realización preferida de la presente solicitud, la trombina se aísla de un producto sanguíneo seleccionado del grupo que consiste en sangre entera, suero o plasma, incluyendo compuestos sanguíneos aislados y productos sanguíneos procesados. Una trombina obtenida de una fuente natural puede ser una trombina obtenida al aislar de un producto sanguíneo según se define anteriormente y posteriormente activar la trombina aislada, p. ej. al usar cualquier tromboplastina o al usar veneno de víbora, tal como veneno de víbora de Russell.

40 La trombina según la presente invención se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica. Esto puede incluir cualquier método conocido en la técnica para la producción de ADN recombinante mediante manipulación genética, p. ej. a través de transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN. Esto incluye métodos que comprenden la producción recombinante de trombina y la posterior activación de protrombina, p. ej. al usar tromboplastina o al usar veneno de víbora de Russell, a fin de obtener trombina.

50 Por ejemplo, el ADN recombinante que codifica protrombina, p. ej. un plásmido, también puede contener una secuencia de ADN que codifica un marcador seleccionable para seleccionar células que se han transfectado satisfactoriamente con el plásmido. En un ejemplo de la presente invención, el plásmido también puede conferir

resistencia a un marcador seleccionable, p. ej. al fármaco antibiótico G418, al aportar un gen de resistencia, p. ej. el gen de resistencia neo que confiere resistencia a G418.

5 La producción de trombina puede incluir cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN recombinante en células eucarióticas mediante transfección, p. ej. a través de electroporación o microinyección. Por ejemplo, la expresión recombinante de trombina humana se puede alcanzar al introducir un plásmido de expresión que contiene la secuencia de ADN que codifica protrombina humana bajo el control de una o más secuencias reguladoras tales como un promotor fuerte, en una línea de células hospedadoras adecuada mediante un método de transfección apropiado que dé como resultado células que tengan las secuencias introducidas establemente integradas en el genoma. El método de coprecipitación de fosfato cálcico es un ejemplo de un método de transfección que se puede usar según la presente invención.

10 La producción de trombina también puede incluir cualquier método conocido en la técnica para el cultivo de dichas células transformadas, p. ej. de un modo continuo o discontinuo, y la expresión de la trombina, p. ej. constitutiva o con inducción. En un ejemplo específico de la presente invención, el ácido nucleico que codifica trombina contenido en el organismo hospedador de la presente invención se expresa a través de un modo de expresión seleccionado del grupo que consiste en expresión inducida, transitoria y permanente. Se puede emplear cualquier sistema de expresión conocido en la técnica o disponible comercialmente para la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica trombina, incluyendo el uso de sistemas reguladores tales como promotores, potenciadores, etc. adecuados, p. ej., controlables.

15 La producción de trombina también puede incluir cualquier método conocido en la técnica para el aislamiento de la proteína, p. ej. del medio de cultivo o al recoger las células transformadas. Por ejemplo, las células que producen trombina se pueden identificar al aislar poblaciones derivadas de una sola célula, es decir, clones celulares, a través de dilución después de transfección y opcionalmente a través de la adición de un fármaco selectivo al medio. Después del aislamiento, los clones celulares identificados se pueden cultivar hasta la confluencia a fin de permitir la medida del contenido de trombina del sobrenadante de cultivo celular mediante la técnica de ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA).

20 Adicionalmente, la producción de trombina puede incluir cualquier método conocido en la técnica para la purificación de trombina, p. ej. a través de cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. En una realización preferida, la trombina se puede purificar de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de intercambio aniónico dependiente de calcio de semiafinidad, p. ej. en un sistema libre de endotoxinas. La trombina purificada o la trombina se puede analizar mediante métodos conocidos en la técnica para analizar proteínas recombinantes, p. ej. la técnica de ELISA. Además, se puede determinar la integridad y la actividad de las proteínas. Está dentro del conocimiento de un experto en la técnica elegir los parámetros óptimos, tales como sistema tamponador, temperatura y pH para el sistema de detección respectivo que se vaya a usar.

25 En un ejemplo específico de la presente invención, la trombina según la presente invención se expresa en un tipo de célula hospedadora con la capacidad para realizar modificaciones postraduccionales. La capacidad para realizar modificaciones postraduccionales de trombina o líneas de células hospedadoras que expresan trombina se puede analizar, por ejemplo, mediante análisis espectrométrico de masas.

30 El tipo de célula hospedadora usado para la producción recombinante de trombina puede ser cualquier célula de mamífero, preferiblemente con la capacidad para realizar modificaciones postraduccionales de trombina. No existe una limitación particular para los medios, los reactivos y las condiciones usados para cultivar las células en el cultivo celular usado para la producción recombinante de trombina incluyendo cultivar las células de un modo continuo o discontinuo. La proteína trombina deseada que ha sido expresada por las células y que, dependiendo del sistema de transfección/el vector usado, está contenida en las células o se secreta al medio para cultivar células, se puede aislar/recuperar del cultivo celular usando métodos conocidos en la técnica, según se menciona anteriormente en la presente memoria.

35 El término "trombina", según se usa en la presente memoria, comprende cualquier trombina que se obtenga al producir y aislar trombina según cualquier método disponible en la técnica anterior y divulgado en la presente memoria seguido por una activación posterior de protrombina, p. ej. al usar tromboplastina o veneno de víbora de Russell.

40 Según la presente invención, el inhibidor de trombina se selecciona del grupo que consiste en la actualidad en dabigatrán, ximelagatrán y argatroban. En una realización más preferida de la presente invención, el inhibidor de trombina es dabigatrán.

45 La muestra que contiene al menos un inhibidor de trombina directa proporcionada en la etapa (a) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directa en una muestra según la presente invención contiene un fluido corporal seleccionado del grupo que consiste en suero y orina. En una realización preferida de la presente invención, la muestra comprende orina.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, la muestra comprende orina y el al menos un inhibidor de trombina directa es dabigatrán.

Métodos para obtener las muestras anteriores son conocidos en la técnica anterior.

La muestra se puede derivar de un mamífero, preferiblemente un mamífero seleccionado del grupo que consiste en ser humano, ratón, rata, cerdo, gato, perro, caballo, cabra, ganado bovino, vaca y mono y/u otros. En una realización preferida de la presente invención, la muestra se deriva de un ser humano.

5 En una realización más preferida de la presente invención, la muestra se deriva de un paciente al que se ha administrado la trombina antes de la etapa (a) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención. El paciente se puede seleccionar del grupo que consiste en ser humano, ratón, rata, cerdo, gato, perro, caballo, cabra, ganado bovino, vaca y mono y/u otros. Lo más preferiblemente, el paciente es un ser humano. En una realización preferida de la presente invención, la muestra es una muestra como la definida en la presente memoria.

10 En una realización preferida, la muestra se prepurifica antes de la etapa (a) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención. En una realización más preferida de la presente invención, la prepurificación comprende la etapa de retirar impurezas que evita que el inhibidor de trombina se una a trombina.

15 La composición que contiene al menos una trombina proporcionada en la etapa (b) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención puede ser cualquier composición que contiene al menos una trombina y también puede contener sales tamponadoras adecuadas. En una realización preferida de la presente invención, la composición que contiene al menos una trombina es isotónica dentro de los límites fisiológicos del valor de pH y puede ser de intensidad iónica normal o baja.

20 Según la presente invención, el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionado en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención está conectado covalentemente a al menos una sustancia detectable. El término "sustancia detectable" no exhibe ninguna limitación particular y se puede seleccionar del grupo que consiste en marcadores radiactivos, colorantes fluorescentes, compuestos que tienen una actividad enzimática, marcadores magnéticos, antígenos y compuestos que tienen una gran afinidad de unión para una sustancia detectable. Un compuesto que tiene una reactividad enzimática tal como la enzima luciferasa que produce una señal luminosa durante el contacto con el sustrato respectivo también se puede usar como una sustancia detectable que se puede conectar covalentemente a dicho sustrato. Acoplar una sustancia detectable a un antígeno permite la detección de la sustancia por un complejo anticuerpo/enzima (siendo la enzima, p. ej., fosfatasa) que cataliza una reacción cromática detectable cuando se usa un sustrato adecuado. Un compuesto con una gran afinidad de unión para una sustancia detectable diferente tal como biotina que se une a una sustancia detectable conectada covalentemente, p. ej., a estreptavidina, es una posibilidad adicional para elaborar una sustancia detectable. En una realización preferida de la presente solicitud, la sustancia detectable es para-nitroanilina.

35 El sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionado en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención es cualquier sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable que pueda ser escindido por trombina de modo que la sustancia detectable se libere del sustrato cromogénico. En una realización preferida de la presente invención, la conjugación del sustrato cromogénico a la sustancia detectable es a través del conector Isoleucina-Glutamina-Glicina-Arginina-X (Ile-Glu-Gly-Arg-X) o a través del conector Glicina-Prolina-Arginina-X (Ile-Pro-Arg-X), en donde X es cualquier aminoácido cargado positivamente. En una realización preferida de la presente solicitud, el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable es una secuencia de aminoácidos que contiene la secuencia Ile-Glu-Gly-Arg-X o Ile-Pro-Arg-X, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, en el sitio en el que se une la sustancia detectable, con la condición de que la estructura del sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable sea tal que la trombina escinda la secuencia Ile-Glu-Gly-Arg-X o Ile-Pro-Arg-X bajo condiciones fisiológicas a temperatura ambiente.

45 En una realización preferida de la presente invención, el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable es una sustancia fluorogénica. En una realización más preferida de la presente invención, el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable se selecciona del grupo que consiste en hidrocioruro de Bencil-Isoleucina-Glutamina-Glicina-Arginina-para-nitroanilina, Tosil-Glicina-Prolina-Arginina-para-nitroanilina, rodamina 110 y bis-p-tosil-L-glicil-L-prolil-L-argininamida. En una realización particularmente preferida de la presente invención, el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable es hidrocioruro de Bencil-Isoleucina-Glutamina-Glicina-Arginina-para-nitroanilina.

55 Las condiciones adecuadas para la unión del al menos un inhibidor de trombina directo a trombina y que permiten que la trombina libere la sustancia detectable del sustrato cromogénico en la etapa (d) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención pueden tener lugar en una solución tamponadora. Si se usa un tampón en la etapa (d) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención, puede contener cualquier compuesto que no afecte negativamente al complejo inhibidor-trombina que se forma y a la liberación de la sustancia detectable del sustrato cromogénico por la trombina. En una realización preferida del método para detectar al menos un inhibidor de

trombina directo en una muestra según la presente invención, las condiciones en la etapa (d) comprenden el uso de una solución tamponadora que sea isotónica y esté dentro de los límites fisiológicos del valor del pH. Puede ser de intensidad iónica normal o baja. Las sales tamponadoras usadas en la etapa (d) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención pueden ser cualquier sal tamponadora con la condición de que dicha sal tamponadora no afecte negativamente al complejo inhibidor-trombina que se forma ni a la liberación de la sustancia detectable del sustrato cromogénico por la trombina.

La etapa (d) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención se puede llevar a cabo bajo cualesquiera condiciones adecuadas para la unión del al menos un inhibidor de trombina directo a trombina y que permitan que la trombina libere la sustancia detectable del sustrato cromogénico sin ninguna limitación. Esto comprende, p. ej., cualquier temperatura, período de tiempo y agitación de la solución tamponadora adecuados. En una realización preferida de la presente invención, la incubación se lleva a cabo a una temperatura que varía de aproximadamente 20°C a aproximadamente 37°C durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 minutos. En una realización más preferida de la presente invención, la incubación se lleva a cabo a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 20 minutos.

En una realización preferida, el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención incluye la etapa de retirar el sustrato cromogénico después de la etapa (d) y antes de la etapa (e). El sustrato cromogénico se puede retirar mediante métodos muy conocidos en la técnica. Ejemplos para la retirada del sustrato cromogénico son, pero no se limitan a, por ejemplo, el uso de anticuerpos o enzimas que se unan específicamente al sustrato cromogénico. En una realización preferida de la presente solicitud, los anticuerpos o las enzimas, preferiblemente enzimas de coagulación, que se unen específicamente al sustrato cromogénico se unen a un soporte como el definido en la presente memoria. Además, el sustrato cromogénico se puede conectar covalentemente a un compuesto con una gran afinidad de unión para un compuesto diferente tal como biotina que se une a un compuesto conectado covalentemente a, p. ej., estreptavidina, o a un compuesto magnético, es una posibilidad adicional para retirar el sustrato cromogénico.

La retirada del sustrato cromogénico se puede llevar a cabo mediante métodos estándar. Por ejemplo, si el uno o más o la totalidad de los anticuerpos o las enzimas, preferiblemente enzimas de coagulación, que se unen específicamente al sustrato cromogénico están conjugados a biotina, el sustrato cromogénico se puede retirar mediante la unión de la biotina a estreptavidina y la retirada posterior del complejo biotina-estreptavidina, p. ej. mediante centrifugación o, si la estreptavidina está conjugada a un soporte adecuado, como un material resinoso, mediante cromatografía en columna. Como una alternativa, si los anticuerpos o las enzimas, preferiblemente enzimas de coagulación, que se unen específicamente al sustrato cromogénico están conectados covalentemente a un compuesto magnético, el sustrato cromogénico se puede retirar al unir dicho sustrato cromogénico a través de un compuesto magnético que tiene la polaridad opuesta. Las condiciones de reacción para realizar la retirada del sustrato cromogénico dependen del método de retirada seleccionado. Está dentro del conocimiento del experto en la técnica elegir los parámetros óptimos, tales como el sistema tamponador, la temperatura y el pH para el sistema de retirada respectivo que se vaya a usar.

Las condiciones de reacción para medir la cantidad de sustancia detectable liberada en la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención dependen del método de detección seleccionado. Está dentro del conocimiento del experto en la técnica elegir los parámetros óptimos, tales como sistema tamponador, temperatura y pH para el sistema de detección respectivo que se vaya a usar.

La etapa de medida (e) del método definido anteriormente puede comprender uno o más métodos de detección seleccionados del grupo que consiste en inmunotransferencia, inmunoprecipitación, inmunocaptura, inmovilización en anticuerpos monoclonales de antígenos plaquetarios o ensayo de inmuoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), citometría de flujo, tecnología de micromatrices proteínicas, espectroscopía, espectrometría de masas, cromatografía, resonancia plasmónica superficial, extinción de fluorescencia y/o transferencia de energía fluorescente. El método de detección para medir la sustancia detectable se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consisten en un ensayo enzimático, un ensayo cromogénico, un luminoensayo, un ensayo fluorogénico y un radioinmunoensayo. Las condiciones de reacción para realizar la detección del marcador detectable dependen del método de detección seleccionado. Está dentro del conocimiento del experto en la técnica elegir los parámetros óptimos, tales como el sistema tamponador, la temperatura y el pH para el sistema de detección respectivo que se vaya a usar. En una realización preferida de la presente solicitud, la sustancia detectable para-nitroanilina y la para-nitroanilina liberada se detecta a través de la medida de la absorción de la muestra a 405 nm.

Si la sustancia detectable se detecta a través de anticuerpos que se unen específicamente a la sustancia detectable, los anticuerpos se pueden inmovilizar sobre un soporte, preferiblemente un soporte sólido. El término "soporte" no tiene limitaciones específicas, y se refiere, por ejemplo, a un material polimérico insoluble, que puede ser un polímero orgánico, tal como poliamida o un polímero vinílico (p. ej. poli(met)acrilato, poliestireno y poli(alcohol vinílico) o derivados de los mismos), un polímero natural tal como celulosa, dextrano, agarosa, quitina y poliaminoácidos, o un polímero inorgánico, tal como vidrio o metalohidróxido. El soporte puede estar en la forma de un microportador, partículas, membranas, tiras, papel, película, cuentas o placas, tales como placas de microvaloración o micromatrices. El término "micromatriz", según se usa en la presente memoria, puede significar

cualquier disposición de anticuerpos en ubicaciones referenciables sobre un soporte dando como resultado el llamado "biochip". El soporte también se puede usar como material resinoso, que se puede usar en una cromatografía en columna.

5 En una realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención es un método para una prueba de diagnóstico inmediato que usa una muestra que no es plasma o sangre entera. Cuando el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención es un método de prueba de diagnóstico inmediato, la composición que contiene trombina proporcionada en la etapa (b) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención y/o la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención se inmovilizan sobre una tira de prueba. La mezcla de la muestra de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) y/o la composición de la etapa (c) en la etapa (d) se obtiene al aplicar una muestra de prueba según se define en la presente memoria sobre la posición respectiva en la tira de prueba, sobre la que está inmovilizada la composición que contiene trombina y/o la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable. La medida de la cantidad de sustancia liberada según la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención se efectúa al insertar la tira de prueba en un instrumento que es adecuado para la medida de la cantidad de sustancia liberada. En una realización preferida de la presente invención, el instrumento es un instrumento transportable, portátil o de mano.

20 En una realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención es un método para una prueba de diagnóstico inmediato y la composición que contiene trombina proporcionada en la etapa (b) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención se inmoviliza sobre una tira de ensayo y la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención no se inmoviliza sobre la tira de prueba. La mezcla de la muestra de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) en la etapa (d) se obtiene al aplicar una muestra de prueba como la definida en la presente memoria sobre la posición respectiva de la tira de prueba, sobre la que está inmovilizada la composición que contiene trombina.

30 En una realización, la tira de prueba se inserta en un instrumento que es adecuado para proporcionar la composición de la etapa (c) y para la medida de la cantidad de sustancia liberada. La mezcla de la muestra de la etapa (a) y la composición de la etapa (b) con la composición de la etapa (c) en la etapa (d) se obtiene al aplicar la composición de la etapa (c) sobre la posición respectiva en la tira de prueba, sobre la que la composición que contiene trombina está inmovilizada y ya mezclada con la muestra de prueba, en el instrumento de prueba. La medida de la cantidad de sustancia liberada según la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención se efectúa mediante el instrumento en el que se ha insertado la tira de prueba. En una realización preferida de la presente invención, el instrumento es un instrumento transportable, portátil o de mano.

40 En otra realización, la composición de la etapa (c) se aplica manualmente, por ejemplo al usar una pipeta. La mezcla de la muestra de la etapa (a) y la composición de la etapa (b) con la composición de la etapa (c) en la etapa (d) se obtiene al aplicar la composición de la etapa (c) sobre la posición respectiva en la tira de prueba, sobre la que la composición que contiene trombina está inmovilizada y ya mezclada con la muestra de prueba. La medida de la cantidad de sustancia liberada según la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención se efectúa al determinar los cambios ópticos de la muestra mezclada, por ejemplo un cambio de color. Esta determinación se puede llevar a cabo, por ejemplo, al comparar la apariencia óptica de la mezcla con la apariencia óptica de un control negativo y/o un control positivo, que se puede proporcionar, por ejemplo, sobre la tira de prueba o en un manual proporcionado por el fabricante de la tira de prueba. Los cambios ópticos de la muestra mezclada también se pueden llevar a cabo, por ejemplo, al comparar la apariencia óptica de la mezcla con la apariencia óptica de controles positivos que tienen diferentes concentraciones del inhibidor de trombina directo, por ejemplo obtenidos usando una serie de dilución estándar.

50 En otra realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención es un método para una prueba de diagnóstico inmediato y la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención se inmoviliza sobre una tira de prueba y la composición que contiene trombina proporcionada en la etapa (b) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención no se inmoviliza sobre la tira de prueba. La mezcla de la muestra de la etapa (a) con la composición de la etapa (c) en la etapa (d) se obtiene al aplicar una muestra de prueba como la definida en la presente memoria sobre la posición respectiva en la tira de prueba, sobre la que está inmovilizada la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable.

60 En una realización, la tira de prueba se inserta en un instrumento que es adecuado para proporcionar la composición de la etapa (b) y para la medida de la cantidad de sustancia liberada. La mezcla de la muestra de la etapa (a) y

la composición de la etapa (c) con la composición de la etapa (b) en la etapa (d) se obtiene al aplicar la composición de la etapa (b) sobre la posición respectiva en la tira de prueba, sobre la que la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable está inmovilizada y ya mezclada con la muestra de prueba, en el instrumento de prueba. La medida de la cantidad de sustancia liberada según la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención se efectúa mediante el instrumento en el que se ha insertado la tira de prueba. En una realización preferida de la presente invención, el instrumento es un instrumento transportable, portátil o de mano.

En otra realización, la composición de la etapa (b) se aplica manualmente, por ejemplo al usar una pipeta. La mezcla de la muestra de la etapa (a) y la composición de la etapa (b) con la composición de la etapa (c) en la etapa (d) se obtiene al aplicar la composición de la etapa (b) sobre la posición respectiva en la tira de prueba, sobre la que la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable está inmovilizada y ya mezclada con la muestra de prueba. La medida de la cantidad de sustancia liberada según la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención se efectúa al determinar cambios ópticos de la muestra mezclada, por ejemplo un cambio de color. Esta determinación se puede llevar a cabo, por ejemplo, al comparar la apariencia óptica de la mezcla con la apariencia óptica de un control negativo y/o un control positivo, que se puede proporcionar, por ejemplo, sobre la tira de prueba o en un manual proporcionado por el fabricante de la tira de prueba. Los cambios ópticos de la muestra mezclada también se pueden llevar a cabo, por ejemplo, al comparar la apariencia óptica de la mezcla con la apariencia óptica de controles positivos que tienen diferentes concentraciones del inhibidor de trombina directo, por ejemplo, obtenidos usando una serie de dilución estándar.

Cuando el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención es un método para una prueba de diagnóstico inmediato, el inhibidor de trombina directo, la muestra, la composición que contiene trombina, la trombina, la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable, la sustancia cromogénica, la sustancia detectable y/o cada una de las etapas (a) a (e) son preferiblemente como se definen en la presente memoria. En una realización particularmente preferida de la presente invención, el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionado en la etapa (c) se selecciona del grupo que consiste en marcadores radiactivos, compuestos que tienen una actividad enzimática, marcadores magnéticos, antígenos y compuestos que tienen una gran afinidad de unión para una sustancia detectable.

En una realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención es un método para una prueba de diagnóstico inmediato como la definida en la presente memoria, la muestra es orina y el inhibidor de trombina directo es dabigatrán. Preferiblemente, (i) la composición que contiene trombina proporcionada en la etapa (b) o (ii) la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) se inmovilizan sobre una tira de prueba. En una realización preferida, el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable es hidrocloreto de Bencil-Isoleucina-Glutamina-Glicina-Arginina-para-nitroanilina. La tira de prueba se inserta en la muestra de orina. A continuación, (i) en caso de que la composición que contiene trombina proporcionada en la etapa (b) ya esté inmovilizada sobre la tira de prueba, se añade la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c), o (ii) en caso de que la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) ya esté inmovilizada sobre la tira de prueba, se añade la composición que contiene trombina proporcionada en la etapa (b). Cuantos más cambios ópticos de la muestra mezclada puedan observarse, preferiblemente, más amarilla se vuelva la muestra mezclada, menos inhibidores de trombina están en la muestra.

En una realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención es un método para una prueba de diagnóstico inmediato según se define en la presente memoria, y la muestra es suero u orina. En esta realización, la composición que comprende trombina proporcionada en la etapa (b) del método de la presente invención y la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) del método de la presente invención se inmovilizan sobre una tira de prueba. En particular, una primera matriz, p. ej. una matriz de poli(cloruro de vinilo) (PVC), se usa como material para ligarse a otras matrices, p. ej. glucosa comprimida o papel de filtro. Una de estas otras matrices se incuba con la composición que comprende trombina anterior y la otra se incuba con la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable anterior. Estas otras matrices están ligadas a la primera matriz en diferentes posiciones, preferiblemente sobre dos caras de la primera matriz, formando así la tira de prueba. Para realizar el método de la presente invención, la tira de prueba se incuba con la muestra durante un tiempo corto, p. ej. uno o dos segundos. Después de eso, la tira de prueba se incuba en un medio, p. ej. un tampón, preferiblemente tampón de Tris. Durante la incubación, las matrices liberan trombina, el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable y la muestra al medio. Posteriormente, la trombina reacciona con el sustrato y, si está presente, el inhibidor de trombina directo en la muestra. Después de un cierto tiempo de reacción, p. ej. 10 minutos, se forma un compuesto coloreado, que indica la reacción entre la trombina y el sustrato. El color formado en ausencia de inhibidor puede ser amarillo, p. ej. cuando se usa un sustrato que libera paranitroanilina. En caso de que estén presentes grandes concentraciones de inhibidor en la muestra, no se desarrolla color. La cantidad de color formada se correlaciona con la concentración de inhibidor en la muestra. En

una realización preferida, se puede añadir otro color a una de las otras matrices anteriores, p. ej. azul de metileno con cambios durante el desarrollo del color amarillo. Según esto, el medio anterior es verde en caso de que no haya inhibidor presente en la muestra y azul en caso de que haya grandes concentraciones de inhibidor en la muestra. También se puede usar cualquier otro color adicional para producir un color diferente al amarillo.

- 5 Los anticuerpos que se unen específicamente a la sustancia detectable o los anticuerpos que se unen específicamente al sustrato cromogénico, si el sustrato cromogénico se retira, se pueden inmovilizar sobre el soporte directamente mediante acoplamiento covalente o a través de un portador tal como una molécula conectora o un anticuerpo inmovilizado sobre el soporte. Además, los anticuerpos que se unen específicamente a la sustancia detectable o el soporte pueden estar conectados covalentemente a un marcador detectable que puede ser cualquier
- 10 marcador detectable adecuado conocido en la técnica. En una realización preferida de la presente invención, el marcador detectable es biotina o una sustancia magnética.

En una realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención contiene además después de la etapa (e) una etapa (f) que determina la cantidad de inhibidor de trombina en la muestra al correlacionar la cantidad de sustancia detectable liberada con la cantidad de inhibidor de trombina en la muestra.

15

La cantidad de sustancia detectable liberada disminuye con un incremento de inhibidor de trombina en la muestra.

La cuantificación de la sustancia detectable, que preferiblemente da como resultado la determinación de la cantidad de inhibidor de trombina en la muestra, se puede llevar a cabo mediante métodos estándar. En una realización preferida de la presente invención, la cantidad de inhibidor de trombina en la muestra se calcula a partir de una curva de calibración obtenida por un inhibidor de trombina en cantidades definidas.

20

La presente invención se refiere además a un uso de una composición que contiene trombina para controlar el transcurso del tratamiento con al menos un inhibidor de trombina directo en un paciente. En otra realización preferida, el uso de una composición que contiene trombina para controlar el transcurso del tratamiento con al menos un inhibidor de trombina directo en un paciente comprende el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención según se define en la presente memoria. En una realización preferida de la presente invención, la trombina, el inhibidor de trombina y/o el paciente es como se define en la presente memoria. En una realización preferida de la presente invención, el transcurso del tratamiento se controla al detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra, más preferiblemente en una muestra de prueba que comprende suero, orina o cualquier otro fluido corporal.

25

Se describe en la presente memoria una composición que contiene trombina para el uso en el control del transcurso del tratamiento con inhibidores de trombina directos en un paciente con propósitos de diagnóstico. Además, se describe en la presente memoria una composición que contiene trombina para el uso en el control del transcurso del tratamiento con inhibidores de trombina directos en un paciente con propósitos de diagnóstico, en donde un riesgo elevado de trombosis se asocia con un incremento de inhibidores de trombina en la muestra. En una realización preferida, la trombina, el inhibidor de trombina y/o el paciente es como se define en la presente memoria.

30

35

Por otra parte, se describe en la presente memoria un estuche de diagnóstico para controlar el transcurso del tratamiento con inhibidores de trombina directos en un paciente que comprende una composición que contiene trombina y una composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable. En una realización preferida, el estuche contiene además cualquier medio para llevar a cabo el método para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra según la presente invención según se define en la presente memoria. En particular, el estuche puede contener uno o más de los siguientes: un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable según se define en la presente memoria, anticuerpos que se unen específicamente a la sustancia detectable según se definen en la presente memoria, trombina u proteínas de trombina modificadas que se unen específicamente al sustrato cromogénico según se definen en la presente memoria, un soporte con anticuerpos o enzimas de trombina inmovilizados que se unen específicamente a la sustancia detectable según se define en la presente memoria, un soporte con anticuerpos inmovilizados que se unen específicamente al sustrato cromogénico según se define en la presente memoria, soluciones tamponadoras según se definen en la presente memoria, recipientes de reacción y/o medios para medir la cantidad de sustancia detectable liberada según se definen en la presente memoria, incluyendo tampones, cuando sea apropiado. En una realización preferida de la presente invención, la trombina, el inhibidor de trombina directo y/o el paciente es como se define en la presente memoria.

40

45

50

Uno de los aspectos subyacentes a la presente invención es medir la concentración/actividad de un inhibidor de trombina directo como dabigatrán con una prueba cromogénica a partir de muestras para medir otros componentes sanguíneos (parámetros hepáticos, parámetros renales, colesterol, etc.) o hemograma sin una extracción de sangre adicional para la coagulación sanguínea. Usando la presente invención, se puede determinar la concentración de un inhibidor de trombina como dabigatrán en orina sin una extracción de sangre adicional. En lugar del dabigatrán, otros inhibidores de trombina directos en matrices distintas al plasma se pueden medir con una prueba cromogénica.

55

Los inhibidores de trombina directos inhiben trombina exógena también sin la presencia de antitrombina o trombina

endógena. Así, se hace posible la medida a partir de suero, orina y otras matrices. La invención resuelve el problema de que los inhibidores de trombina directos inhiban el colorante para-nitroanilina a partir de un sustrato cromogénico de un modo dependiente de la dosis solo en presencia de trombina exógena. Ya no es necesaria una extracción de sangre separada para la medida de la coagulación usando el método según la presente invención.

5 Para un examen en orina, se puede omitir una extracción de sangre. El riesgo de efectos secundarios de una extracción de sangre se reduce (tubo de suero, tubo de hemograma) o se elimina (orina).

Es esencial para la presente invención que el dabigatrán y otros inhibidores de trombina directos inhiban trombina añadida exógenamente sin la presencia de otras proteínas de coagulación. De ese modo, se puede detectar la concentración/actividad de inhibidores de trombina, como dabigatrán, en suero y otras matrices biológicas.

10 Las ventajas de la invención son que usando el método según la presente invención, los efectos secundarios y los riesgos asociados con una extracción de sangre se reducen (detección en suero) o se eliminan (detección en orina), y no es necesaria la toma especial de un "tubo de coagulación".

La base de la presente invención es el hecho de que, para la determinación fotométrica de la inhibición de trombina, el fibrinógeno y, para los inhibidores de trombina directos, la antitrombina no son necesarios como cofactores. Es esencial para la presente invención que la concentración/actividad de medicamentos que inhiben directamente trombina se pueda cuantificar a través de la inhibición de trombina exógena y sobre medios/matrices por medio de un sustrato cromogénico específico para trombina, que no sean plasma (Figura 1).

15

Las figuras muestran:

20 Figura 1: Vista general de los reaccionantes en el sistema de prueba y el procedimiento de reacción y la medida en una realización preferida de la presente invención.

Figura 2: Ilustración de la inhibición de trombina al incrementar la cantidad de dabigatrán (eje x) en plasma (método hasta ahora), en suero y orina (nuevos métodos). Pequeñas cantidades de dabigatrán inhiben poca/nada de trombina, de modo que se libera mucho colorante del sustrato cromogénico (gran absorción, eje y, nm = nanómetros de la longitud de onda para medir el colorante). Cuanto menos dabigatrán sea necesario para inhibir la liberación del colorante (valores bajos de la absorción), más sensible se hace la detección para el dabigatrán. Los factores influyentes presentes en el plasma no están presentes en suero ni orina.

25

Figura 3: Ilustración de la inhibición de trombina al incrementar la cantidad de hirudina (eje x) en plasma (método hasta ahora), en suero y orina (nuevos métodos). Véase la explicación para la figura 2.

La presente invención se ilustrará ahora en los siguientes ejemplos sin que se limite a los mismos.

30 Ejemplos

Ejemplo 1:

a) Medida de dabigatrán en suero con trombina y S2238

Reactivos: Solución 1: Agua destilada

Solución 2:

35 Tampón de Tris Tris 6,06 g

NaCl 10,23 g

EDTA 2,79 g

pH 8,4

añádanse 1.000 ml de agua destilada

40 Solución 3.:

dilución en serie dabigatrán con 0 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 700 ng/ml, disuelto en suero

Solución 4:

Trombina 71 nkat (Chromogenix, Essen Germany)

45 disuelta en 10 ml de agua dest.

Solución 5:

ES 2 640 574 T3

S-2238 25 mg (Chromogenix, Essen Germany)

disuelto en 33,7 ml de agua dest.

Solución 6:

ácido acético: 50%

5 a.1) Descripción de la prueba: curva estándar para la determinación de dabigatrán en suero

25 µl de suero con concentración conocida de dabigatrán,

diluido 1 : 15 en tampón de tris

+ 25 µl de trombina

2 min. de incubación a 37°C

10 + 50 µl de S-2238

20 min. de incubación a 37°C

+ 25 µl de ácido acético 50%

Medida a 405 nm

Preparación de una curva estándar (OD frente a ng/ml)

15 Descripción de la prueba: determinación de muestras de suero

25 µl de suero, que contiene dabigatrán, diluido 1: 15 en tampón de tris

+ 25 µl de trombina

2 min. de incubación a 37°C

+ 50 µl S-2238

20 20 min. de incubación a 37°C

+ 25 µl de ácido acético 50%

Medida a 405 nm

El cálculo de la concentración de dabigatrán se llevó a cabo usando la curva estándar. La concentración de dabigatrán se determinó mediante la densidad óptica (OD) de la muestra.

25 b) Medida de dabigatrán en orina con trombina y S-2238

Los reactivos son los mismos que en la medida de dabigatrán en orina.

Descripción de la prueba: curva estándar

25 µl de dabigatrán en orina

+ 25 µl de trombina

30 2 min. de incubación a 37°C

+ 50 µl de S-2238

20 min. de incubación a 37°C

+ 25 µl de ácido acético 50%

Medida a 405 nm

35 Preparación de una curva estándar (OD frente a ng/ml)

Descripción de la prueba: determinación de muestras de orina

25 µl de orina

ES 2 640 574 T3

- + 25 µl de trombina
- 2 min. de incubación a 37°C
- + 50 µl de S-2238
- 20 min. de incubación a 37°C
- 5 + 25 µl de ácido acético 50%
- Medida a 405 nm
- c) Inhibición por factor IIa de dabigatrán (en suero)
- Reactivos:
- Dabigatrán
- 10 Se disuelve S-2238 (25 mg) (Chromogenix) en 40 ml de agua dest.
- Trombina (SIGMA T-8885): por vial 10 U
- la aprotinina se diluye hasta 500 KIU/ml con agua. dest.
- Tampón de tris: Tris 6,06 g
- NaCl 10,23 g
- 15 EDTA 2,79 g
- pH 8,4 se ajusta con HCl 1,0 M
- añádanse 1.000 ml de agua dest.
- Solución de trabajo de trombina/aprotinina:
- 20 Disuélvase 1 ampolla de 10 U de trombina con 1 ml de agua dest. y se lleva hasta 11,5 ml con tampón de Tris.
- Adicionalmente, añádase 1 ml de aprotinina 500 KIU/ml.
- Prepárese la curva estándar:
- Dilúyase dabigatrán en las concentraciones: 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0,5, 0, 25 µg/ml en tampón de Tris. Posteriormente, dilúyase cada punto estándar de nuevo con suero 1:10.
- Concentraciones finales: 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 µg/ml
- 25 Realización de la prueba:
- Estándar o muestra 10 µl
- Tampón de Tris 100 µl
- Incubación 5 minutos
- Solución de trabajo de trombina 100 µl
- 30 Incubación 60 s
- Sustrato cromogénico 50 µl
- Incubación 5 min.
- Ácido acético 50 µl
- Medida a 405 nm
- 35 Cada muestra de suero necesita su propio valor del blanco, es decir 50 µl de ácido acético
- + 50 µl de sustrato cromogénico
- + 100 µl de solución de trabajo de trombina

ES 2 640 574 T3

+ 100 µl de tampón de Tris

+ 10 µl de muestra a probar

d) Inhibición por factor IIa de dabigatrán (en orina)

Reactivos:

5 Dabigatrán

Se disuelve S-2238 (25 mg) (Chromogenix) en 40 ml de agua dest.

Trombina (SIGMA T-8885): por vial 10 U

la aprotinina se diluye hasta 500 KIU/ml con agua dest.

Tampón de tris: Tris 6,06 g

10 NaCl 10,23 g

EDTA 2,79 g

pH 8,4 se ajusta con HCl 1,0 M

añádanse 1.000 ml de agua dest.

15 Solución de trabajo de trombina/aprotinina:

Disuélvase 1 ampolla de 10 U de trombina con 1 ml de agua dest. y se lleva hasta 11,5 ml con tampón de Tris. Adicionalmente, añádase 1 ml de aprotinina 500 KIU/ml.

Prepárese la curva estándar:

20 Dilúyase dabigatrán en las concentraciones: 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 µg/ml en tampón de Tris. Posteriormente, dilúyase cada punto estándar de nuevo con orina 1:10.

Concentraciones finales: 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 µg/ml

Realización de la prueba:

Estándar o muestra 10 µl

Tampón de Tris 100 µl

25 Incubación 5 minutos

Solución de trabajo de trombina 100 µl

Incubación 60 s

Sustrato cromogénico 50 µl

Incubación 5 min.

30 Ácido acético 50 µl

Medida a 405 nm

Cada muestra de suero necesita su propio valor del blanco, es decir 50 µl de ácido acético

+ 50 µl de sustrato cromogénico

+ 100 µl de solución de trabajo de trombina

35 + 100 µl de tampón de Tris

+ 10 µl de muestra a probar

ES 2 640 574 T3

e) Inhibición por factor IIa de hirudina (en orina)

Reactivos:

Hirudina

Se disuelve S-2238 (25 mg) (Chromogenix) en 40 ml de agua dest.

5 Trombina (SIGMA T-8885): por vial 10 U

la aprotinina se diluye hasta 500 KIU/ml con agua dest.

Tampón de tris: Tris 6,06 g

NaCl 10,23 g

EDTA 2,79 g

10 pH 8,4 se ajusta con HCl 1,0 M

añádanse 1.000 ml de agua dest.

Solución de trabajo de trombina/aprotinina:

Disuélvase 1 ampolla de 10 U de trombina con 1 ml de agua dest. y se lleva hasta 11,5 ml con tampón de Tris. Adicionalmente, añádase 1 ml de aprotinina 500 KIU/ml.

15 Prepárese la curva estándar:

Dilúyase hirudina en las concentraciones: 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 µg/ml en tampón de Tris. Posteriormente, dilúyase cada punto estándar de nuevo con orina 1:10.

Concentraciones finales: 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 µg/ml

Realización de la prueba:

20 Estándar o muestra 10 µl

Tampón de Tris 100 µl

Incubación 5 minutos

Solución de trabajo de trombina 100 µl

Incubación 60 s

25 Sustrato cromogénico 50 µl

Incubación 5 min.

Ácido acético 50 µl

Medida a 405 nm

Cada muestra de suero necesita su propio valor del blanco, es decir 50 µl de ácido acético

30 + 50 µl de sustrato cromogénico

+ 100 µl de solución de trabajo de trombina

+ 100 µl de tampón de Tris

+ 10 µl de muestra a probar

f) Cálculo de la concentración de dabigatrán e hirudina

35 La concentración de dabigatrán e hirudina se llevó a cabo usando la curva estándar. La concentración de dabigatrán/hirudina se determinó mediante la densidad óptica (OD) de la muestra.

El inhibidor de trombina directo dabigatrán se añadió a muestras de plasma, suero y orina en diferentes concentraciones. El reactivo trombina (de Chromogenix) y el sustrato cromogénico (S2238 de Chromogenix) se añadieron a las muestras, se incubaron y se midieron en un fotómetro a una longitud de onda de 405 nanómetros

(nm). El dabigatrán/la hirudina inhibe la actividad de trombina y así la liberación de para-nitroanilina del sustrato cromogénico S2238 de un modo dependiente de la dosis (Figuras 2 y 3).

Debido a la ausencia de antitrombina y otros cofactores para heparinas y la ausencia de trombina y otras proteínas de coagulación en la marcha del ensayo, la detección de dabigatrán y otros inhibidores de trombina es menos sensible y propensa a influencias (Figuras 2 y 3).

Otros estudios han mostrado que el dabigatrán en suero y orina se puede medir con una prueba cromogénica sin la adición de plasma.

g) Determinación de dabigatrán en tiras

Las tiras se revisten en la punta con material absorbente (Merck AG, Darmstadt). Esta zona se incubó con 10 microlitros de solución de trombina o con solución de S2238, cada una, respectivamente. Se incubó orina (10 microlitros) sobre las tiras durante 15 min. a temperatura ambiente con orina procedente de un paciente tratado con dabigatrán. Las tiras se superponen de modo que los reaccionantes puedan penetrar entre las zonas de las tiras. Si la orina contiene dabigatrán, la zona con los reactivos permanece clara (blanca). Disminuyendo la cantidad de dabigatrán, el color cambia a amarillo. El color se puede cuantificar usando el programa Color Colorpicker 1.0. este programa cuantifica los colores rojo, amarillo y azul. Los valores correspondientes para el color azul se dan con relación a la concentración de dabigatrán en orina. La orina del paciente se diluyó 1:10 y 1:100 mediante una muestra de orina que no contenía dabigatrán para obtener bajas concentraciones de dabigatrán. Los valores medios se calcularon a partir de valores dobles. Los valores se calcularon a partir de una curva obtenida a partir de orina de una persona sana enriquecida con dabigatrán (Tabla 1).

Tabla 1:

Colorimetría de las tiras que contienen pequeñas zonas preparadas con los reactivos para la determinación de dabigatrán en orina.

Valor del Colorpicker	concentración de dabigatrán
47,5	85 ng
41,5	8,5 ng
34,5	0,85 ng

Lo anterior es una demostración de la prueba de concepto para el análisis de diagnóstico inmediato de dabigatrán en orina humana. El color que aparece depende de la concentración de dabigatrán en orina. Los resultados se tiene que leer como sigue: una alta concentración de dabigatrán inhibe la liberación de para-nitroanilina por trombina dando como resultado ausencia de color / blanco / claro. Bajas concentraciones de dabigatrán dan como resultado una liberación de para-nitroanilina y un color amarillo.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para detectar al menos un inhibidor de trombina directo en una muestra, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar una muestra que contiene al menos un inhibidor de trombina directo;
- 5 (b) proporcionar una composición que contiene trombina;
- (c) proporcionar una composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable, en donde el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable se puede escindir mediante trombina, de modo que la sustancia detectable se libere del sustrato cromogénico;
- 10 (d) mezclar la muestra de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) y la composición de la etapa (c) bajo condiciones que permitan la unión del al menos un inhibidor de trombina directo a trombina y que permitan que la trombina libere la sustancia detectable del sustrato cromogénico;
- (e) medir la cantidad de sustancia detectable liberada,
- en donde la muestra no contiene plasma sanguíneo citratado,
- en donde la muestra contiene un fluido sanguíneo seleccionado del grupo que consiste en suero y orina, y
- 15 en donde el inhibidor de trombina se selecciona del grupo que consiste en dabigatrán, ximelagatrán y argatrobán.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreuro de Bencil-Isoleucina-Glutamina-Glicina-Arginina-para-nitroanilina, Tosil-Glicina-Prolina-Arginina-para-nitroanilina, rodamina 110 y bis-p-tosil-L-glicil-L-prolil-L-argininamida.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable es hidrocloreuro de Bencil-Isoleucina-Glutamina-Glicina-Arginina-para-nitroanilina.
- 20 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor de trombina es dabigatrán.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una prueba de diagnóstico inmediato.
6. El método según la reivindicación 5, en el que la composición que contiene trombina proporcionada en la etapa (b) o la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado a una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) se inmovilizan sobre una tira de prueba.
- 25 7. El método según la reivindicación 6, en el que la muestra es orina.
8. Uso de una composición que contiene trombina para controlar el transcurso del tratamiento con inhibidores de trombina en un paciente, en donde el uso comprende el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

Principio de la invención

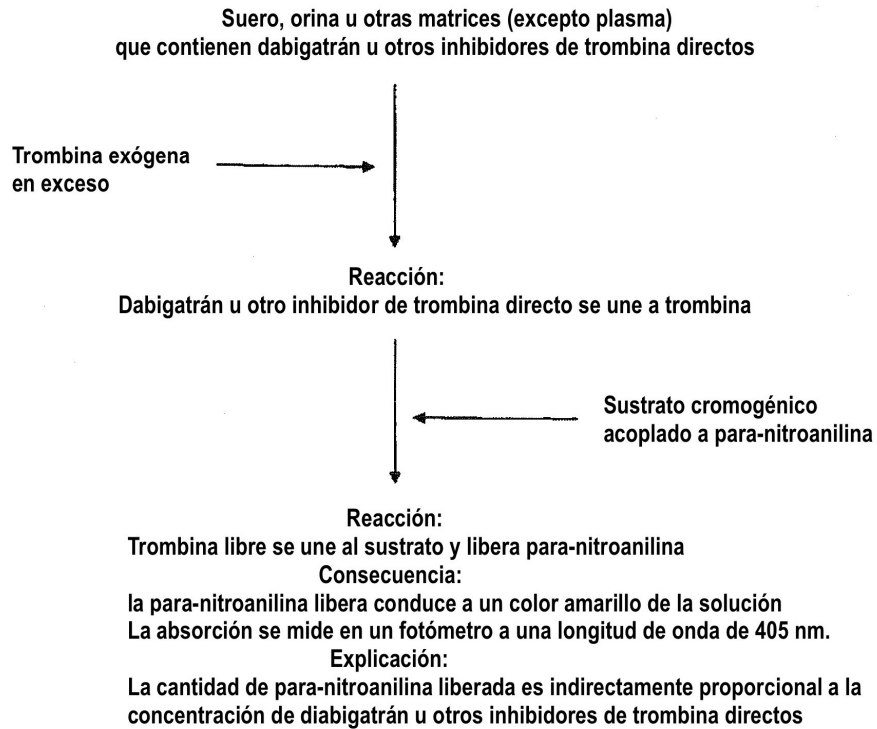


Figura 1

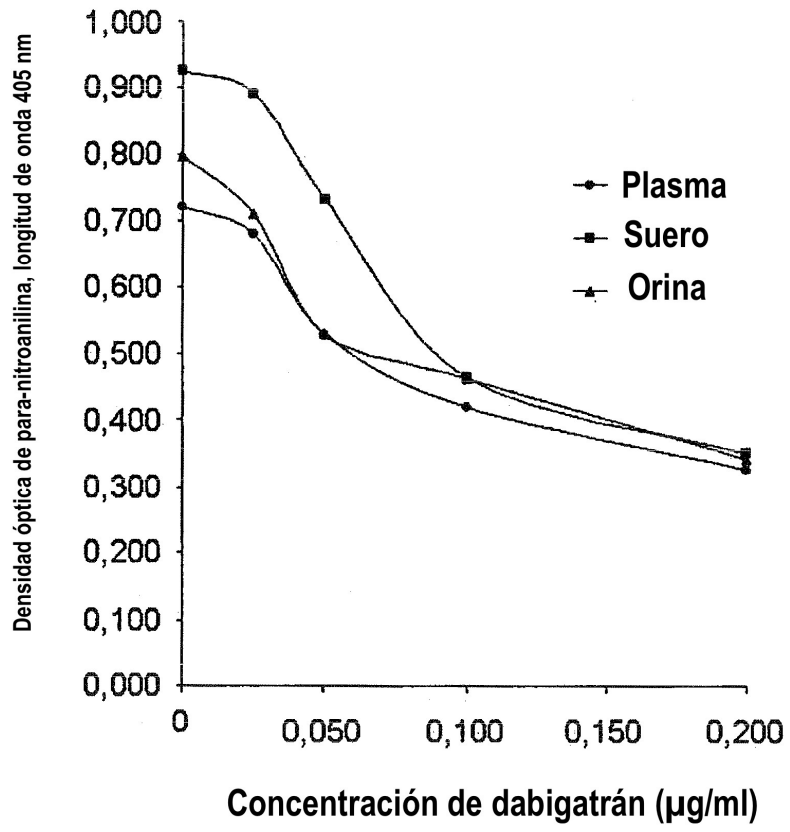


Figura 2

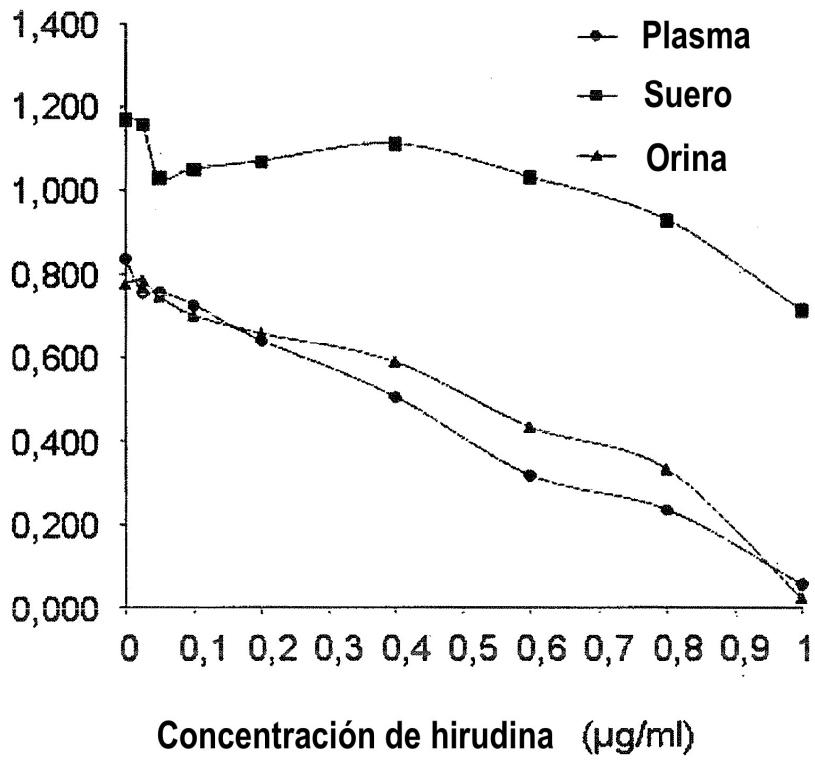


Figura 3