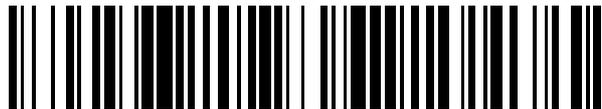


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 738**

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: **07.11.2011 PCT/EP2011/005586**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12069139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2011 E 11788367 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2643475**

54 Título: **Análisis de inhibidores directos del factor Xa**

30 Prioridad:

22.11.2010 GB 201019674

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

06.03.2018

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 2 657 738 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

Análisis de inhibidores directos del factor Xa

- 5 La presente invención se refiere a un método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa artificialmente sintetizado en una muestra de orina, que comprende la etapa de mezclar una muestra de orina que contiene un inhibidor del factor Xa artificialmente sintetizado con una composición que contiene el factor Xa en condiciones que permiten al factor Xa liberar una sustancia detectable de un sustrato cromogénico.
- 10 Las ensayos de coagulación de la sangre se realizan en muestras de plasma de seres humanos/animales haciendo que las muestras de sangre incoagulable con citrato de sodio (relación de volumen de sangre/anticoagulante 9:1). Para llevar a cabo la determinación de los valores de medición individuales de la coagulación sanguínea, se centrifuga la sangre y se separan las células (en el sedimento) de los componentes líquidos de la sangre (plasma).
- 15 Para medir la coagulación sanguínea, se añade cloruro de calcio y un activador de la coagulación sanguínea al plasma. En métodos especiales para determinar los factores de coagulación individuales o los inhibidores exógenos, se utiliza una prueba fotométrica. En estos métodos, el colorante para-nitroanilina se libera mediante una enzima de coagulación añadida exógenamente (por ejemplo, el factor Xa) a partir de un sustrato cromogénico (hidrocloruro de N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-L-glicil-L-arginina-para-nitroanilina y otros), midiendo la actividad/concentración de los inhibidores del factor Xa o sustancias que inhiben el factor Xa de una manera dependiente de la concentración.
- 20 El resultado es una disminución lineal o sigmoidal de la liberación de la para-nitroanilina, medida a 405 nanómetros en el fotómetro, dependiendo de la concentración del inhibidor del factor Xa (Harenberg J, *Modified anti-factor Xa chromogenic substrate assay for heparin and low molecular weight heparins*. Arztl. Lab. 1987, 33: 39-41).
- 25 Para otros ensayos en sangre, tales como de enzimas hepáticas, parámetros renales, electrolitos o colesterol, la sangre se coagula mediante la adición de un activador (por ejemplo, caolín). En este caso, se utilizan las proteínas de coagulación, antitrombina y fibrinógeno. Estos factores se mezclan con células sanguíneas en un coágulo de sangre en un tubo de coagulación, en el que se extrae la sangre. El suero puede encontrarse en el sobrenadante, que no contiene estas proteínas de coagulación. La medición de estos parámetros clínico-químicos es más fácil en el suero. Las concentraciones de fármacos también se miden en suero, excepto para los fármacos de coagulación para uso clínico.
- 30 Las heparinas, las heparinas de bajo peso molecular, los heparinoides, el fondaparinux y otros polisacáridos necesitan cofactores en la sangre (antitrombina, cofactor de la heparina II) para activar su efecto anticoagulante o para acelerarlo hasta 1.000 veces. Estos cofactores están presentes en el plasma, por lo que se utilizan muestras de plasma citratado para analizar la actividad de los inhibidores de la coagulación sanguínea. Las ensayos en suero no son posibles con métodos para la rutina clínica (Harenberg J, *Neue Antikoagulantien*, Zett Verlag, Steinen, 2007).
- 35 Otros inhibidores de la coagulación de la sangre no necesitan cofactores en la sangre para hacerse activos. Estos son los llamados inhibidores de la coagulación directa de las enzimas de coagulación. Los más importantes por el momento son el grupo de inhibidores directos del factor Xa y de la trombina. Su actividad/concentración se mide en el plasma citratado con diferentes métodos/activadores. El rivaroxaban es el primero de los inhibidores directos del factor Xa para uso clínico. Se publican los métodos de determinación relevantes para detectar la concentración/actividad del rivaroxaban. Todos los análisis se realizan con plasma anticoagulado con citrato (Samama M M, Martinoli J, Leflem L, *et al.*, *Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban—on oral, direct factor Xa inhibitor*. *Thromb Haemost* 2010; 103: 815-825; Tripodi A, Guinet C, Samama M. *The Internationalized Normalized Ratio (INR) Calibrated for Rivaroxaban (INRivaroXaban) Normalizes Prothrombin Time Results for Patients Treated with this Drug*. *J Thromb Haemost* 2010, disponible en Internet; Harenberg J, Marx S, Krämer R *et al.*, *Reduction of variability between prothrombin time reagents of plasma samples containing rivaroxaban using the WHO/RBT 90 thromboplastin reagent*, presentado para publicación).
- 40
- 45
- 50 Hasta ahora, no ha habido ningún método de detección en la rutina clínico-química para los inhibidores de la coagulación sanguínea a partir del suero. El suero tiene diferentes ventajas sobre el plasma: En medicina, las muestras de suero son más frecuentemente tomadas de los pacientes que las muestras de plasma. La extracción de sangre es menos susceptible a las influencias en las muestras de suero que en las muestras de plasma. En el caso de una "mala" extracción de sangre, la coagulación sanguínea puede ser activada. Por lo tanto, los resultados están influenciados por los factores de coagulación. Esto no es posible para muestras de suero, ya que se realiza una coagulación sanguínea en el tubo después de la extracción.
- 55
- 60 Las soluciones actuales tienen la desventaja de requerir una extracción de sangre separada para obtener muestras de plasma para el análisis. La antitrombina, el factor X/Xa y otras proteínas de coagulación están presentes 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 hematomas, o efectos secundarios generalizados, tales como inflamación de la vena o transmisión de infecciones (por ejemplo, hepatitis, VIH).
- 65 En este contexto, Berettini *et al.*, (Berettini, M. *et al.*; *Am J Clin Pathol*, 103(4); 1995; pp. 391-395) describe un ensayo de sustrato cromogénico de la actividad del inhibidor de la vía del factor tisular en el plasma y en el suero.

Además, Van Dreden *et al.*, (Van Dreden, P. *et al.*; *Blood*, 102(11); 2003; pp. 120b-121b) describe ensayos de sustratos cromogénicos para la actividad indirecta de Fondaparinux anti-factor Xa en el plasma. Asimismo, Samama M. M. *et al.*, *Thrombosis and Haemostasis*, 104(5); 2010; pp. 1078-1079) describe un ensayo cromogénico para inhibidores del factor Xa en el plasma.

5 Por lo tanto, el problema que subyace de la presente invención es proporcionar nuevos medios para una detección eficaz de inhibidores del factor Xa que superen las deficiencias de los protocolos conocidos en la técnica.

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

En particular, la presente invención se refiere a un método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa artificialmente sintetizado en una muestra de orina, que comprende las etapas de:

- 15 (a) proporcionar una muestra de orina que contenga al menos un inhibidor directo del factor Xa artificialmente sintetizado;
- (b) proporcionar una composición que contenga factor Xa;
- (c) proporcionar una composición que contenga un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable;
- 20 (d) mezclar la muestra de orina de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) y la composición de la etapa (c) en condiciones que permitan la unión del al menos un inhibidor directo del factor Xa artificialmente sintetizado con el factor Xa y que permitan al factor Xa liberar la sustancia detectable del sustrato cromogénico; y
- 25 (e) medir la cantidad de sustancia detectable liberada.

Según la presente invención, bajo la expresión "factor Xa" no subyace ninguna restricción específica y puede incluir cualquier factor Xa activado obtenido a partir de una fuente natural o mediante tecnología de ADN recombinante, o un derivado biológicamente activo de la misma.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado biológicamente activo" incluye cualquier derivado de una proteína, complejo de proteína o polipéptido que tenga sustancialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de FXa 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 deleciones, adiciones y/o sustitución de aminoácidos cuya ausencia, presencia y/o sustitución, respectivamente, no tienen ningún impacto negativo sustancial sobre la actividad del polipéptido, por ejemplo, aminoácidos que están situados en una parte de la secuencia polipeptídica que no contribuye a la actividad biológica de la proteína. También se incluyen en la presente solicitud deleciones, adiciones y/o sustituciones menores de aminoácidos de las respectivas secuencias polipeptídicas que no alteran la actividad biológica de dicho polipéptido como derivados biológicamente activos.

40 Un factor Xa obtenido a partir de una fuente natural puede ser cualquier factor Xa aislado 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, humano, rata, gato, perro y mono. En una realización particularmente preferida, el factor Xa se aísla de un producto sanguíneo de un ser humano. En una realización preferida de la presente solicitud, el factor Xa se aísla de un producto sanguíneo seleccionado del grupo que consiste en sangre completa, suero o plasma, incluyendo compuestos sanguíneos aislados y productos sanguíneos procesados. Un factor Xa obtenido a partir de una fuente natural puede ser un factor Xa obtenido aislando el factor X de un producto sanguíneo tal como se ha definido anteriormente y activando posteriormente el factor X aislado, para convertirse en factor Xa, por ejemplo, usando cualquier tromboplastina o usando veneno de víbora, como el veneno de víbora de Russell.

50 El factor Xa de acuerdo con la presente invención se puede producir por cualquier método conocido en la técnica. Esto puede incluir cualquier método conocido en la técnica para la producción de ADN recombinante por ingeniería genética, por ejemplo, mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN. Esto incluye métodos que comprenden la producción recombinante del factor X y la posterior activación del factor X, por ejemplo, utilizando tromboplastina según el ensayo de víbora de Russell, con el fin de obtener el factor Xa.

60 Por ejemplo, el ADN recombinante que codifica para el factor X, por ejemplo, un plásmido, también puede contener una secuencia de ADN que codifica un marcador seleccionable para seleccionar las células que han sido transfectadas con éxito con el plásmido. En un ejemplo de la presente invención, el plásmido también puede conferir resistencia a un marcador seleccionable, por ejemplo, al fármaco antibiótico G418, suministrando un gen de resistencia, por ejemplo, el gen de resistencia neo que confiere resistencia a G418.

65 La producción del factor Xa puede incluir cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN recombinante en las células eucariotas por transfección, por ejemplo, a través de electroporación o microinyección. Por ejemplo, la expresión recombinante del factor X humano puede lograrse introduciendo un plásmido de expresión que contiene la secuencia de ADN que codifica el factor X humano bajo el control de una o más secuencias

reguladoras, tales como un promotor fuerte, en una línea celular huésped adecuada mediante un método apropiado de transfección que da como resultado células que tienen las secuencias introducidas integradas de forma estable en el genoma. El método de coprecipitación de fosfato de calcio es un ejemplo de un método de transfección que se puede usar de acuerdo con la presente invención.

La producción del factor Xa puede incluir también cualquier método conocido en la técnica para el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo, de manera continua o por lotes, y la expresión del factor X, por ejemplo, constitutiva o por inducción. En un ejemplo específico de la presente invención, el ácido nucleico que codifica para el factor X presente en el organismo huésped de la presente invención, se expresa mediante un modo de expresión seleccionado del grupo que consiste en la expresión inducida, transitoria y permanente. Se puede emplear cualquier sistema de expresión conocido en la técnica o comercialmente disponible para la expresión de un factor X codificante de ácido nucleico recombinante, incluyendo el uso de sistemas reguladores tales como, por ejemplo, controlables, promotores, potenciadores, etc., adecuados.

La producción del factor Xa también puede incluir cualquier método conocido en la técnica para el aislamiento de la proteína, por ejemplo, a partir del medio de cultivo o recogiendo las células transformadas. Por ejemplo, las células productoras del factor X se pueden identificar aislando las poblaciones derivadas de una sola célula, es decir, los clones de células, a través de la dilución después de la transfección y, opcionalmente, mediante la adición de un fármaco selectivo al medio. Después del aislamiento, los clones de células identificados pueden cultivarse hasta confluencia con el fin de permitir la medición del contenido de factor X del sobrenadante del cultivo celular mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés).

Adicionalmente, la producción del factor Xa puede incluir cualquier método conocido en la técnica para la purificación del factor X o factor Xa, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. En una realización preferida, el factor X se puede purificar a partir de sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de intercambio aniónico dependiente de calcio de semi-afinidad, por ejemplo, en un sistema libre de endotoxina. El factor Xa o el factor X purificados pueden analizarse por métodos conocidos en la técnica para analizar proteínas recombinantes, por ejemplo, la técnica ELISA. Además, se puede evaluar la integridad y la actividad de las proteínas. Está dentro del conocimiento de un experto en la técnica elegir los parámetros óptimos, tales como el sistema tampón, la temperatura y el pH para el sistema de detección respectivo que se va a utilizar.

En un ejemplo específico de la presente invención, el factor X de acuerdo con la presente invención se expresa en un tipo de célula huésped con la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales. La capacidad para realizar modificaciones postraduccionales de líneas celulares huésped que expresan el factor X puede analizarse, por ejemplo, mediante análisis de espectrometría de masas.

El tipo de célula huésped utilizada para la producción recombinante del factor Xa puede ser cualquier célula de mamífero, preferiblemente con la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales del factor X. No hay ninguna limitación particular a los medios, reactivos y condiciones usados para cultivar las células en el cultivo celular utilizado para la producción recombinante del factor Xa que incluye el cultivo de las células de una manera continua o discontinua. La proteína del factor X deseada que ha sido expresada por las células, dependiente del sistema de transfección/vector utilizado, está presente en las células o secretada en el medio para cultivar células, se puede aislar/recuperar del cultivo celular utilizando métodos conocidos en la técnica, como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria.

El término factor Xa, tal como se utiliza en la presente memoria, comprende cualquier factor Xa que se obtiene produciendo y aislando el factor X de acuerdo con cualquier método disponible en la técnica anterior y descrito en esta memoria seguido por una activación posterior del factor X, por ejemplo, utilizando la tromboplastina o el veneno de víbora de Russell.

La expresión "al menos un inhibidor directo del factor Xa", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier inhibidor natural o artificialmente sintetizado de la actividad del factor Xa. En una realización preferida de la presente invención, el inhibidor del factor Xa se selecciona del grupo que consiste actualmente en apixaban, betrixaban, edoxaban, otamixaban, y rivaroxaban y/u otros en desarrollo. En una realización más preferida de la presente invención, el inhibidor del factor Xa es rivaroxaban.

La muestra de orina se puede derivar de un mamífero, preferiblemente de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en humanos, ratones, ratas, cerdos, gatos, perros, caballos, cabras, bovinos, vacas y monos y/u otros. En una realización preferida de la presente invención, la muestra de orina se deriva de un ser humano.

En una realización más preferida de la presente invención, la muestra de orina se deriva de un paciente al que se ha administrado el factor Xa antes de la etapa (a) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención. El paciente se puede seleccionar del grupo que consiste en 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, la muestra se prepurifica antes de la etapa (a) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención. En una realización más preferida de la presente invención, la pre-purificación comprende la etapa de retirar las impurezas que impiden que el inhibidor del factor Xa se una al factor Xa.

La composición que contiene al menos un factor Xa proporcionado en la etapa (b) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, puede ser cualquier composición que contenga al menos un factor Xa y también puede contener sales tampón adecuadas. En una realización preferida de la presente invención, la composición que contiene al menos un factor Xa es isotónica dentro de los límites fisiológicos del valor de pH y puede ser de resistencia iónica normal o baja.

De acuerdo con la presente invención, el sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionado en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención está unido covalentemente a al menos una sustancia detectable. La expresión "sustancia detectable" no presenta ninguna limitación particular y se puede seleccionar del grupo que consiste en marcadores radiactivos, colorantes fluorescentes, compuestos que tienen actividad enzimática, marcadores magnéticos, antígenos y compuestos que tienen una alta afinidad de unión por una sustancia detectable. Un compuesto que tiene una reactividad enzimática tal como la enzima luciferasa, que produce una señal luminosa en contacto con el sustrato respectivo, también se puede usar como una sustancia detectable que puede estar enlazada covalentemente a dicho sustrato. El acoplamiento de una sustancia detectable a un antígeno permite la detección de la sustancia mediante un complejo anticuerpo/enzima (la enzima que es, por ejemplo, fosfatasa) que cataliza una reacción de color detectable cuando se usa un sustrato adecuado. Un compuesto con una alta afinidad de unión por una sustancia detectable diferente tal como biotina que se une a una sustancia detectable unida covalentemente a, por ejemplo, estreptavidina, es una posibilidad adicional para hacer que una sustancia sea detectable. En una realización preferida de la presente solicitud, la sustancia detectable es para-nitroanilina.

El sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionado en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, es cualquier sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable que puede escindirse por el factor Xa, de manera que la sustancia detectable se libera del sustrato cromogénico. En una realización preferida de la presente invención, la conjugación del sustrato cromogénico con la sustancia detectable es a través del enlazador isoleucina-glutamina-glicina-arginina-X (Ile-Glu-Gli-Arg-X) o a través del enlazador isoleucina-ácido aspártico-glicina-arginina-X (Ile-Asp-Gli-Arg-X), en donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina. En una realización preferida de la presente solicitud, el sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable es una secuencia de aminoácidos que contiene la secuencia Ile-Glu-Gli-Arg-X o Ile-Asp-Gli-Arg-X, en donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, en el sitio donde se une la sustancia detectable, siempre que la estructura del sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable sea tal que el factor Xa escinda la secuencia Ile-Glu-Gli-Arg-X o Ile-Asp-Gli-Arg-X en condiciones fisiológicas a temperatura ambiente.

En una realización preferida de la presente invención, el sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable es una sustancia fluorogénica. En una realización más preferida de la presente invención, la sustancia fluorogénica se selecciona del grupo que consiste en sal de acetato de N-benzoil-Ile-Glu-Gli-Arg p-nitroanilida, hidrocloreuro de N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-L-glicil-L-arginina-para-nitroanilina, e hidrocloreuro de Boc-Ile-Glu-Gli-Arg-7-amido-4-metilcumarina. En una realización particularmente preferida de la presente invención, el sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable es hidrocloreuro de N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-L-glicil-L-arginina-para-nitroanilina.

Las condiciones adecuadas para la unión del al menos un inhibidor directo del factor Xa al factor Xa y que permiten que el factor Xa libere la sustancia detectable del sustrato cromogénico en la etapa (d) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención puede tener lugar en una disolución tampón. Si se usa una disolución tampón en la etapa (d) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, ésta puede contener cualquier compuesto que no afecte negativamente a la formación del complejo inhibidor del factor Xa y liberar la sustancia detectable del sustrato cromogénico por el factor Xa. En una realización preferida del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, las condiciones en la etapa (d) comprenden el uso de una disolución tampón que sea isotónica y esté dentro de los límites fisiológicos del valor del pH. Ésta puede ser de fuerza iónica normal o baja. Las sales tampón usadas en la etapa (d) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, pueden ser cualquier sal tampón siempre y cuando dicha sal tampón no afecte negativamente a la formación del complejo inhibidor del factor Xa y la liberación de la sustancia detectable del sustrato cromogénico por el factor Xa.

La etapa (d) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, se puede llevar a cabo en cualesquiera condiciones adecuadas para la unión del al menos un inhibidor directo del factor Xa con el factor Xa y que permiten que el factor Xa libere la sustancia detectable del sustrato cromogénico sin ninguna limitación. Esto comprende, por ejemplo, cualquier temperatura, período de tiempo y agitación adecuados de la disolución tampón. En una realización preferida de la presente invención, la incubación

se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 20° C y aproximadamente 37° C durante un período de tiempo 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.

5 En una realización preferida, el método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con 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 por métodos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos para la retirada del sustrato cromogénico son, pero no se limitan a, por ejemplo, el uso de anticuerpos o enzimas que se unen específicamente al sustrato cromogénico. En una realización preferida de la presente solicitud, los anticuerpos o enzimas, preferiblemente enzimas de coagulación, que se unen específicamente al sustrato cromogénico se unen a un soporte como se define en la presente memoria. Además, el sustrato cromogénico puede estar covalentemente unido a un compuesto con una alta afinidad de unión por un compuesto diferente tal como biotina, que se une a un compuesto covalentemente unido a, por ejemplo, estreptavidina, o a un compuesto magnético, es una posibilidad adicional para retirar el sustrato cromogénico.

15 La retirada del sustrato cromogénico se puede llevar a cabo por métodos habituales. Por ejemplo, si uno o más de todos los anticuerpos o enzimas, preferiblemente enzimas de coagulación, que se unen específicamente al sustrato cromogénico se conjugan con la biotina, el sustrato cromogénico se puede retirar por unión de la biotina con la estreptavidina y la posterior retirada de la biotina-estreptavidina, por ejemplo, por centrifugación o, si la estreptavidina se conjuga con un soporte adecuado, como un material de resina, mediante cromatografía en columna. Como alternativa, si los anticuerpos o enzimas, preferiblemente enzimas de coagulación, que se unen específicamente al sustrato cromogénico están unidos covalentemente a un compuesto magnético, el sustrato cromogénico puede ser retirado uniendo 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. Es del conocimiento del experto en la técnica elegir los parámetros óptimos, tales como el sistema tampón, la temperatura y el pH para el sistema de retirada respectivo que se va a utilizar.

20 Las condiciones de reacción para medir la cantidad de sustancia detectable liberada en la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, dependen del método de detección seleccionado. Es del conocimiento del experto en la técnica elegir los parámetros óptimos, tales como el sistema tampón, la temperatura y el pH para el sistema de detección respectivo que se va a utilizar.

35 La etapa de medición (e) del método anteriormente definido puede comprender uno o más métodos de detección seleccionados del grupo que consiste en inmunotransferencia, inmunoprecipitación, inmunocaptura, inmovilización de anticuerpos monoclonales de antígenos plaquetarios o ensayos de inmunoabsorción (ELISA) ligado a enzimas, citometría de flujo, tecnología de matriz de proteínas, espectroscopía, espectrometría de masas, cromatografía, resonancia plasmónica superficial, extinción de fluorescencia y/o transferencia de energía de fluorescencia. El método de detección para medir la sustancia detectable se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en un ensayo enzimático, un ensayo cromogénico, un ensayo lumino, un ensayo fluorogénico y un ensayo radioinmune. Las condiciones de reacción para realizar la detección del marcador detectable dependen del método de detección seleccionado. Es del conocimiento del experto en la técnica elegir los parámetros óptimos, tales como el sistema tampón, la temperatura y el pH para el sistema de detección respectivo que se va a utilizar. En una realización preferida de la presente solicitud, la sustancia detectable para-nitroanilina y la para-nitroanilina liberada se detecta mediante la medición de la absorción de la muestra a 405 nm.

45 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 ninguna limitación específica, y se refiere, por ejemplo, a un material polimérico insoluble, que puede ser un polímero orgánico, tal como poliamida o un polímero vinílico (por ejemplo, poli(met)acrilato, poliestireno y alcohol polivinílico, 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 forma de un microportador, partículas, membranas, tiras, papel, película, perlas o placas, tales como placas de microtitulación o micromatrices. El término "micromatriz" tal como se usa en la presente memoria puede significar cualquier disposición de los anticuerpos en localizaciones direccionables sobre un soporte que da como resultado el denominado "biochip". El soporte también se puede usar como material de resina, que se puede usar en una cromatografía en columna.

60 En una realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, es un método para ensayos en el punto de atención utilizando una muestra de orina. Cuando el método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención es un método de ensayo en el punto de atención, la composición que contiene el factor Xa proporcionada en la etapa (b) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención y/o la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, se inmovilizan en una tira de ensayo. El mezclamiento de la muestra de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) y/o la composición de la

- 5 etapa (c) en la etapa (d) se obtiene aplicando una muestra de ensayo como se define en esta memoria en la posición respectiva en la tira de ensayo, en la que se inmoviliza la composición que contiene el factor Xa y/o la composición que contiene la composición que incluye un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable. La medición de la cantidad de sustancia liberada de acuerdo con la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, se logra introduciendo la tira de ensayo en un instrumento que sea adecuado para medir la cantidad de sustancia liberada. En una realización preferida de la presente invención, el instrumento es un instrumento transportable, portátil o de mano.
- 10 En una realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, es un método para ensayos en el punto de atención y la composición que contiene el factor Xa proporcionada en la etapa (b) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención se inmoviliza en una tira de ensayo y la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, no se inmoviliza en la tira de ensayo. El mezclamiento de la muestra de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) en la etapa (d) se obtiene aplicando una muestra de ensayo como se define en la presente memoria en la posición respectiva en la tira de ensayo, sobre la cual es inmovilizada la composición que contiene el factor Xa.
- 15 En una realización, la tira de ensayo se introduce en un instrumento que es adecuado para proporcionar la composición de la etapa (c) y para medir la cantidad de sustancia liberada. El mezclamiento 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 aplicando la composición de la etapa (c) en la posición respectiva en la tira reactiva, sobre la cual la composición que contiene el factor Xa está inmovilizada y ya mezclada con la muestra de ensayo, en el instrumento de ensayo. La medición de la cantidad de sustancia liberada de acuerdo con la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, se logra mediante el instrumento en el que se ha introducido la tira de ensayo. En una realización preferida de la presente invención, el instrumento es un instrumento transportable, portátil o de mano.
- 20 En otra realización, la composición de la etapa (c) se aplica manualmente, por ejemplo, usando una pipeta. El mezclamiento 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 aplicando la composición de la etapa (c) en la posición respectiva en la tira reactiva, sobre la cual la composición que contiene el factor Xa está inmovilizada y ya mezclada con la muestra de ensayo. La medición de la cantidad de sustancia liberada de acuerdo con la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, se logra evaluando los cambios ópticos de la muestra mezclada, por ejemplo, un cambio de color. Esta evaluación se puede llevar a cabo, por ejemplo, comparando 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, en la tira reactiva o en un manual suministrado por el fabricante de la tira reactiva. También, se pueden llevar a cabo los cambios ópticos de la muestra mezclada, por ejemplo, comparando el aspecto óptico de la mezcla con la apariencia óptica de controles positivos que tienen diferentes concentraciones del inhibidor directo del factor Xa, por ejemplo, obtenido usando una serie de dilución estándar.
- 25 En otra realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, es un método para ensayos en el punto de atención y la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, se inmoviliza en una tira de ensayo y la composición que contiene el factor Xa proporcionada en la etapa (b) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, no se inmoviliza en la tira de ensayo. El mezclamiento de la muestra de la etapa (a) con la composición de la etapa (c) en la etapa (d) se obtiene aplicando una muestra de ensayo como se define en la presente memoria en la posición respectiva en la tira de ensayo, sobre la cual se inmoviliza la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable.
- 30 En una realización, la tira de ensayo se introduce en un instrumento que es adecuado para proporcionar la composición de la etapa (b) y para medir la cantidad de sustancia liberada. El mezclamiento 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 aplicando la composición de la etapa (b) en la posición respectiva en la tira reactiva, sobre la cual la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable está inmovilizada y ya mezclada con la muestra de ensayo, en el instrumento de ensayo. La medición de la cantidad de sustancia liberada de acuerdo con la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, se logra mediante el instrumento en el que se ha introducido la tira de ensayo. En una realización preferida de la presente invención, el instrumento es un instrumento transportable, portátil o de mano.
- 35 En otra realización, la composición de la etapa (b) se aplica manualmente, por ejemplo utilizando una pipeta. El mezclamiento de la muestra de la etapa (a) y la composición de la etapa (b) con la composición de la etapa (c) en la
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

etapa (d) se obtiene aplicando la composición de la etapa (b) en la posición respectiva en la tira reactiva, sobre la cual la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable está inmovilizada y ya mezclada con la muestra de ensayo. La medición de la cantidad de sustancia liberada de acuerdo con la etapa (e) del método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, se logra evaluando los cambios ópticos de la muestra mezclada, por ejemplo, un cambio de color. Esta evaluación se puede llevar a cabo, por ejemplo, comparando 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, en la tira reactiva o en un manual suministrado por el fabricante de la tira reactiva. También, se pueden llevar a cabo los cambios ópticos de la muestra mezclada, por ejemplo, comparando el aspecto óptico de la mezcla con la apariencia óptica de controles positivos que tienen diferentes concentraciones de inhibidor directo del factor Xa, por ejemplo obtenido usando una serie de dilución estándar.

Cuando el método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención es un método para ensayos en el punto de atención, el inhibidor directo del factor Xa, la muestra, la composición que contiene factor Xa, el factor Xa, la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable, la sustancia cromogénica, la sustancia detectable y/o cada una de las etapas (a) a (e), son preferiblemente como se define en la presente memoria. En una realización particularmente preferida de la presente invención, el sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionada 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 un valor alto de afinidad de unión por una sustancia detectable.

En una realización preferida de la presente invención, el método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, es un método para ensayos en el punto de atención como se define en el presente documento, la muestra es orina y el inhibidor directo del factor Xa es rivaroxaban. Preferiblemente, (i) la composición que contiene el factor Xa proporcionada en la etapa (b) o (ii) la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) se inmovilizan en una tira de ensayo. En una realización preferida, el sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable es hidrocloreuro de N-benzoil-L-isoileucil-L-glutamil-L-glicil-L-arginina-para-nitroanilina. La tira reactiva se introduce en la muestra de orina. A continuación, (i) en el caso de que la composición que contiene el factor Xa proporcionada en la etapa (b) ya esté inmovilizada sobre la tira de ensayo, se añade la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c), o (ii) en el caso de que la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) ya esté inmovilizada sobre la tira de ensayo, se añade la composición que contiene el factor Xa proporcionada en la etapa (b). Cuantos más cambios ópticos de la muestra mezclada se pueden observar, preferiblemente más amarillo se vuelve la muestra mezclada, menos inhibidores del factor Xa están en la muestra.

Los anticuerpos que se unen específicamente a la sustancia detectable o los anticuerpos que se unen específicamente al sustrato cromogénico, si se retira el sustrato cromogénico, se pueden inmovilizar sobre el soporte directamente mediante acoplamiento covalente o mediante un vehículo tal como una molécula enlazadora o un anticuerpo inmovilizado sobre el soporte. Además, los anticuerpos que se unen específicamente a la sustancia detectable o al soporte pueden estar unidos covalentemente a un marcador detectable, que puede ser cualquier 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 directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención contiene además después de la etapa (e) una etapa

(f) determinar la cantidad de inhibidor del factor Xa en la muestra de orina, correlacionando la cantidad de sustancia detectable liberada con la cantidad de inhibidor del factor Xa en la muestra.

La cantidad de sustancia detectable liberada disminuye con un incremento del inhibidor del factor Xa en la muestra.

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

La presente invención se refiere además al uso de una composición que contiene factor Xa para monitorizar el curso del tratamiento con al menos un inhibidor directo de factor Xa en un paciente, en donde el uso comprende el método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención como se define en la misma.

Además, en la presente invención se describe una composición que contiene factor Xa para su uso en el seguimiento del curso del tratamiento con inhibidores directos del factor Xa en un paciente con fines de diagnóstico.

Asimismo, en la presente invención se describe una composición que contiene factor Xa para su uso en el seguimiento del curso del tratamiento con inhibidores directos del factor Xa en un paciente con fines de diagnóstico, en donde un riesgo elevado de trombosis está asociado con un aumento de inhibidores del factor Xa en la muestra. Preferiblemente, el factor Xa, el inhibidor del factor Xa, y/o el paciente son como se define en la presente memoria.

Además, en la presente invención se describe un kit de diagnóstico para monitorizar el curso del tratamiento con inhibidores directos del factor Xa en un paciente que comprende una composición que contiene factor Xa y composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable. El kit contiene además cualquier medio para llevar a cabo el método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa en una muestra de acuerdo con la presente invención, como se define en la misma. En particular, el kit puede contener uno o más de los siguientes: un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable, como se define en la presente memoria, anticuerpos que se unen específicamente a la sustancia detectable como se define en la presente memoria, factor Xa y proteínas modificadas del factor Xa que se unen específicamente al sustrato cromogénico como se define en la presente memoria, un soporte con anticuerpos inmovilizados o enzimas del factor Xa que se unen específicamente a la sustancia detectable como se define en la presente memoria, un soporte con anticuerpos inmovilizados que se une específicamente al sustrato cromogénico como se define en la presente memoria, disoluciones tampón como se definen en la presente memoria, recipientes de reacción y/o medios para medir la cantidad de sustancia detectable liberada como se define en la presente memoria, que incluyen tampones, cuando sea apropiado. Preferiblemente, el factor Xa, el inhibidor directo del factor Xa, y/o el paciente, son como se define en la presente memoria.

Uno de los aspectos subyacentes a la presente invención es medir la concentración/actividad de un inhibidor directo del factor Xa como el rivaroxaban con un ensayo cromogénico de muestras para medir otros componentes sanguíneos (parámetros del hígado, parámetros del riñón, colesterol, etc.) o hemograma sin una extracción de sangre adicional para la coagulación de la sangre. Utilizando la presente invención se puede determinar la concentración de un inhibidor del factor Xa como el rivaroxaban en la orina sin una extracción sanguínea adicional. En lugar de rivaroxaban, se pueden medir otros inhibidores directos del factor Xa en matrices distintas del plasma con una prueba cromogénica.

Los inhibidores directos del factor Xa inhiben el factor exógeno Xa también sin la presencia de antitrombina o factor X o factor endógeno Xa. Por lo tanto, se hace posible la medición de suero, orina y otras matrices. La invención resuelve el problema de que los inhibidores directos del factor Xa inhiben el colorante para-nitroanilina a partir de un sustrato cromogénico de una manera dependiente de la dosis sólo en presencia del factor Xa exógeno. No es necesaria una extracción de sangre separada para la medición de la coagulación utilizando el método según la presente invención. Para un análisis en la orina, se puede omitir la extracción de sangre. Se elimina el riesgo de efectos secundarios de una extracción de sangre.

Es esencial para la presente invención que el rivaroxaban y otros inhibidores directos del factor Xa inhiban el factor Xa exógeno añadido sin la presencia de otras proteínas de coagulación. De este modo, se puede detectar la concentración/actividad de los inhibidores del factor Xa, como el rivaroxaban, en el suero y en otras matrices biológicas.

Las ventajas de la invención son que utilizando el método de acuerdo con la presente invención, se reducen los efectos secundarios y los riesgos asociados con una extracción de sangre, y la toma especial de un "tubo de coagulación" no es necesaria.

La base de la presente invención es el hecho de que para una determinación fotométrica del inhibidor del factor Xa no es necesario el fibrinógeno, y para los inhibidores directos del factor Xa, no es necesaria la antitrombina como cofactores. Es esencial para la presente invención que la concentración/actividad de los medicamentos que inhiben directamente el factor Xa se pueda cuantificar mediante la inhibición del factor exógeno Xa en y sobre los medios/matrices por medio de un sustrato cromogénico específico del factor Xa, que no sea plasma (Figura 1).

Las figuras muestran:

La Figura 1: Visión general de los reactantes en el sistema de ensayo y el proceso de reacción y la medición en una realización preferida de la presente invención.

La Figura 2: Ilustración de la inhibición del factor Xa mediante el aumento de la cantidad de rivaroxaba (eje x) en plasma (método hasta ahora), en suero y orina (métodos nuevos). Pequeñas cantidades de rivaroxaban inhiben poco/ningún factor Xa, de modo que se libera gran cantidad de colorante del sustrato cromogénico (alta absorción, y eje y, nm = nanómetro de la longitud de onda para medir el colorante). Cuanto menos rivaroxaban sea necesario para inhibir la liberación del colorante (valores bajos de la absorción), más sensible será la detección del rivaroxaban. Los factores de influencia presentes en el plasma no están presentes en el suero y la orina.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos sin estar limitada a los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 a) Medición de rivaroxaban en suero con Factor Xa y S2222

Reactivos: Disolución 1: Agua destilada

10 Disolución 2:
Tampón Tris Tris 6,06 g
NaCl 10,23 g
EDTA 2,79 g
pH 8,4
ad 1.000 ml Agua destilada

15 Disolución 3:
dilución en serie de rivaroxaban 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

20 Disolución 4:
FXa 71 nkat (Chromogenix, Essen Alemania)
disuelto en 10 ml de agua destilada

25 Disolución 5:
S - 2222 25 mg (Chromogenix, Essen Alemania)
disuelto en 33,7 ml de agua destilada

30 Disolución 6:
ácido: 50%

Descripción del ensayo: curva estándar

35 25 µl de suero con una concentración conocida de rivaroxaban,
1:15 diluido en tampón tris
+ 25 µl de FXa
2 min. Incubación a 37° C.
+ 50 µl de S - 2222
20 min. Incubación a 37° C.
+ 25 µl Essigsäure 50%

40 Medición a 405 nm
La preparación de una curva estándar (OD frente a ng/ml)

45 Descripción del ensayo: determinación de muestras de suero

50 25 µl de suero, que contiene rivaroxaban, 1:15 diluido en tampón tris
+ 25 µl de FXa
2 min. Incubación a 37° C.
+ 50 µl de S - 2222
20 min. Incubación a 37° C.
+ 25 µl de ácido 50%

Medición a 405 nm

55 El cálculo de la concentración de rivaroxaban se realizó usando la curva estándar. La concentración de rivaroxaban se determinó por la densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) de la muestra.

b) Medición de rivaroxabano en orina con factor Xa y S2222

60 Los reactivos son los mismos que en la medición de rivaroxaban en suero.

Descripción del ensayo: curva estándar

65 25 µl de rivaroxaban en la orina
+ 25 µl de FXa
2 min. Incubación a 37° C.

ES 2 657 738 T3

+ 50 µl de S - 2222
20 min. Incubación a 37° C.
+ 25 µl de ácido 50%

5 Medición a 405 nm
La preparación de una curva estándar (OD frente a ng/ml)

Descripción del ensayo: determinación de muestras de orina

10 25 µl de orina
+ 25 µl de FXa
2 min. Incubación a 37° C.
+ 50 µl de S - 2222
15 20 min. Incubación a 37° C.
+ 25 µl de ácido 50%

Medición a 405 nm

20 El cálculo de la concentración de rivaroxaban se realizó usando la curva estándar. La concentración de rivaroxaban se determinó por la densidad óptica (OD) de la muestra.

25 Se añadió el inhibidor directo del factor Xa rivaroxaban a muestras de plasma, suero y orina en diferentes concentraciones. Se añadieron a las muestras los reactivos factor Xa (de Chromogenix y Coachrom) y sustrato cromogénico (S2222 de Chromogenix y CS1156 de Coachrom), se incubaron y se midieron en un fotómetro a una longitud de onda de 405 nanómetros (nm). El rivaroxabano inhibe la actividad del factor Xa y por lo tanto la liberación de para-nitroanilina del sustrato cromogénico S2222 de una manera dependiente de la dosis (Figura 2).

30 Debido a la ausencia de antitrombina y otros cofactores para las heparinas y ausencia del factor X, factor Xa y otras proteínas de coagulación en la ronda de ensayo, la detección de rivaroxaban y otros inhibidores del factor Xa es menos sensible y susceptible a influencias (Figura 2).

Los estudios de los autores de la presente memoria han demostrado que el rivaroxaban en suero y orina puede ser medido con un ensayo cromogénico sin la adición de plasma.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para detectar al menos un inhibidor directo del factor Xa artificialmente sintetizado en una muestra de orina, que comprende las etapas de:
- 10 (a) proporcionar una muestra de orina que contenga al menos un inhibidor directo del factor Xa artificialmente sintetizado;
 - (b) proporcionar una composición que contenga factor Xa;
 - (c) proporcionar una composición que contenga un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable;
 - (d) mezclar la muestra de orina de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) y la composición de la etapa (c) en condiciones que permitan la unión del al menos un inhibidor directo del factor Xa artificialmente sintetizado con el factor Xa, y que permitan al factor Xa liberar la sustancia detectable del sustrato cromogénico; y
 - 15 (e) medir la cantidad de sustancia detectable liberada.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable se selecciona del grupo que consiste en sal de acetato de N-benzoil-Ile-Glu-Gli-Arg p-nitroanilida, hidrocloreuro de N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-L-glicil-L-arginina-para-nitroanilina, e hidrocloreuro de Boc-Ile-Glu-Gli-Arg-7-amido-4-metilcumarina, hidrocloreuro de 4-nitrofenil-4-guanidin-benzoato.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable es hidrocloreuro de N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-L-glicil-L-arginina-para-nitroanilina.
- 30 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor del factor Xa se selecciona del grupo que consiste en apixaban, edoxaban, otamixaban y rivaroxaban.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor del factor Xa es rivaroxaban.
- 35 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un ensayo en el punto de atención.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la composición que contiene el factor Xa proporcionada en la etapa (b) o la composición que contiene un sustrato cromogénico conjugado con una sustancia detectable proporcionada en la etapa (c) se inmovilizan en una tira de ensayo.
- 40 8. El uso de una composición que contiene el factor Xa para monitorizar el curso del tratamiento con inhibidores del factor Xa en un paciente, en donde el uso comprende el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

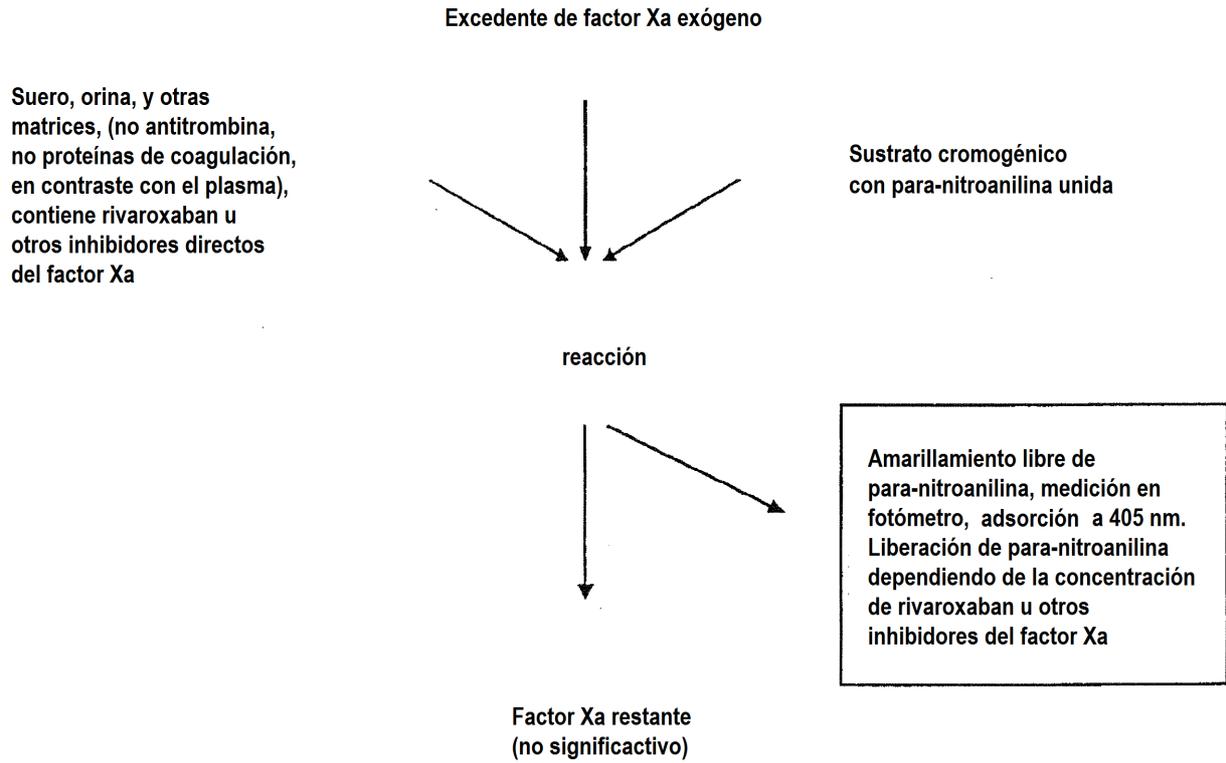


Figura 1

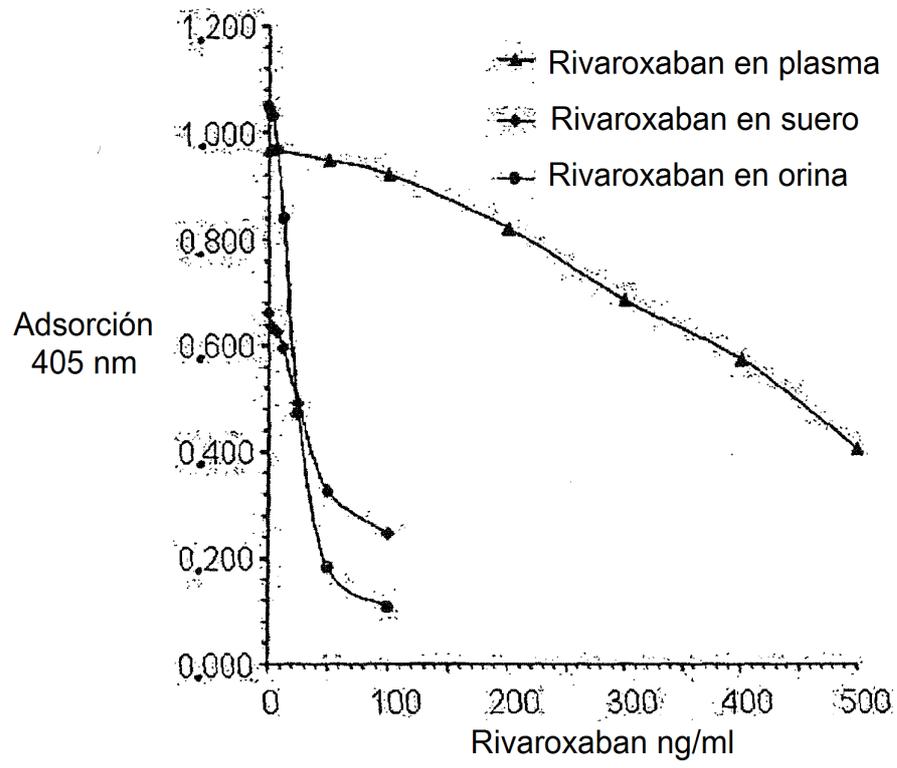


Figura 2